
BC

biochimica clinica

**In questo numero:
DOCUMENTI SIBioC**

**SIEROLOGIA DELLA INFEZIONE
DA SARS-CoV-2**
vedi pag. 87 e pag. 91

**DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA
DI BENCE JONES**
vedi pag. 75



*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

sommario



EDITORIALI

11

Diagnosi biochimica precoce di preeclampsia: un traguardo possibile?
M. Zaninotto, M. Plebani

13

I Big Data e la Medicina di Laboratorio
M. Vidali

RASSEGNE

15

Il ruolo del laboratorio clinico nella diagnosi precoce di preeclampsia
M. Montagnana, A. Tagetti, C. Fava

26

I micro-RNA quali potenziali biomarcatori per la diagnosi e la prognosi del cancro del pancreas: scelte metodologiche e criticità
A. Aita, C. Sperti, L. Moletta, C. De Pittà, C. Millino, B. Pacchioni, S. Pedrazzoli, M. Plebani, D. Basso

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

35

Profilo molecolare multigenico somatico di pazienti affette da cancro ovarico sieroso ad alto grado a lunga sopravvivenza e BRCA-negative
E. De Paolis, M. De Bonis, M. D'Indinosante, G. Scambia, C. Marchetti, A. Urbani, A. Fagotti, A. Minucci

44

Il calcolo del kappa index come valida alternativa alla determinazione delle bande oligoclonali nell'iter diagnostico dei pazienti con sclerosi multipla
I. Crespi, P. Caropreso, L. Calcagno, F. Lombardo, M. Lamona, G. Sedda, M. Maccarini, G. Mengozzi, G. Patrucco

OPINIONI

52

Approcci diagnostici innovativi per le malattie infiammatorie croniche intestinali
A. Padoan, D. Basso, R. D'Incà, G. Arrigoni, M.L. Scapellato, N. Contran, M. Plebani

DOCUMENTI

57

Introduzione ai Big Data e all'Intelligenza Artificiale in Medicina di Laboratorio
R. Guerranti, A. Padoan, D. Angeletti, M. Foracchia, T. Trenti per il Gruppo di Studio SIBioC-Associazione Italiana Sistemi Informativi in Sanità (AISIS) "Big Data e Intelligenza Artificiale"

68

Biomarcatori cardiaci: dove stiamo andando?
A. Clerico, M. Zaninotto, A. Padoan, S. Masotti per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-European Ligand Assay Society, Italia "Biomarcatori Cardiaci"

DOCUMENTI SIBioC

75

Revisione e aggiornamento del documento di consenso SIBioC per la ricerca e quantificazione della proteina di Bence Jones
P. Natali, G. Cigliana, M. Savoia, S. Gelsumini, U. Basile, A. Vernocchi, M.S. Graziani, M. Mussap, G. Palladini

87

Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali
G. Lippi, L. Sciacovelli, T. Trenti, M. Plebani

sommario

NOTIZIE SIBioC

91

Raccomandazioni ad interim di SIBioC per l'analisi sierologica dell'infezione da SARS-CoV-2
G. Lippi, S. Bernardini, M. Ciaccio, T. Trenti, L. Sciacovelli, M. Plebani, per il Gruppo Operativo SIBioC su COVID-19

100

Lab Tests Online Italia. Attività del 2020
G. Messeri, M. Berardi, F. Biancalani

CASI CLINICI

e1

Il valore aggiunto della diagnostica molecolare nelle forme monogeniche di diabete mellito
F. Iafusco, S. Meola, B. Lombardo, A. Gambale, A. Alderisio, S. Genovese, A. Iolascon, L. Pastore, N. Tinto

e4

Rischio clinico ed ematologia di Laboratorio: è possibile affidarsi al solo Volume Corpuscolare Medio per scoprire l'errata identificazione del paziente?
M. Berardi, F. Balboni, S. Buoro

e7

Inspiegabili alterazioni di esami coagulativi
E. Camilleri, AM. Gori, VM. Vivoli, LA. Alessandrello, AP. Cellai, A. Rogolino, M. Berardi, F. Balboni, R. Marcucci

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



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

Biomedica Editore
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

Volume 45

Numero 1 - Marzo 2021

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
e-ISSN 0392-7091



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.

biochimica clinica

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

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

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

Formato delle diverse tipologie di articoli.

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

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

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

Le norme che seguono devono essere obbligatoriamente osservate, pena la non accettazione degli elaborati. Biochimica Clinica aderisce alle norme dell' International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org)

PREPARAZIONE DEL MANOSCRITTO

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

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

Abstract (riassunto in inglese, massimo 250 parole): deve essere preceduto dal titolo in inglese, quando il lavoro è scritto in italiano. I Contributi Scientifici richiedono obbligatoriamente un Abstract strutturato in Introduction, Methods, Results, Discussion.

Non è richiesto il Riassunto in italiano.

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

Per elaborati destinati a sezioni diverse dai Contribuiti Scientifici non è necessaria la suddivisione nei paragrafi sotto menzionati.

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

Metodi: descrivere in maniera esaustiva casistiche cliniche o di popolazione; reagenti chimici e biologici; kit diagnostici, calibratori, materiali di controllo; strumenti e sistemi analitici; metodi analitici; metodi statistici. Nel caso di utilizzo di reagenti e sistemi analitici commerciali di uso corrente è sufficiente indicare il principio del metodo e il sistema analitico commerciale impiegato. Nell'uso dei metodi statistici attenersi alle indicazioni riportate alla fine di queste Norme. Nel caso di utilizzo di casistiche cliniche e/o campioni biologici provenienti da soggetti umani è obbligatoriamente richiesta una dichiarazione (da inserire nel testo) che durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1964, come emendata nel 2013 (<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects>) e, nel caso di utilizzo di campioni biologici appositamente raccolti, è stato ottenuto un specifico Consenso Informato da ciascuno dei soggetti arruolati nello studio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Soper CPR, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic insulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:497-501.
2. Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002;42 Suppl 2:S93-9.
3. Barrati J, Ettalbi M. Thermostable insulinases from *A. ficcum*. In: Fusch A, ed. *Insulin and insulin-containing crops*. London: Elsevier Science Publisher, 1993:211-6.
4. Constantin E, Schnell A, eds. *Mass spectrometry*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1991.

Riportare per esteso tutti i nomi degli Autori di ciascun lavoro fino ad un massimo di tre. Se in numero maggiore di tre, riportare i primi tre seguiti da "et al."

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

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

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

CASI CLINICI

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

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

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

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

Bibliografia: fino a un massimo di 10 voci bibliografiche.

Tabelle/Figure: non più di 2 in totale.

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

INVIO ELETTRONICO DEL MANOSCRITTO

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

Avvertenza importante: Conservare copia di tutti i file inviati.

IMPAGINAZIONE

Testo e tabelle

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

Pagina 2. Abstract in lingua inglese.

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

Figure

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

LETTERA DI ACCOMPAGNAMENTO

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

REVISIONE ED ACCETTAZIONE

L'Editore di BC si riserva di accettare o meno i lavori inviati dopo consultazione di revisori esterni altamente qualificati. Modifiche di stile o di linguaggio nel testo o nell'iconografia possono essere introdotte direttamente nel corso della revisione editoriale e successivamente approvate dagli Autori. Al momento della accettazione del lavoro, il copyright viene trasferito a SIBioC.

ESTRATTI

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

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

INDIRIZZO A CUI INVIARE GLI ELABORATI

e-mail: biochimica.clinica@sibioc.it

Redazione di Biochimica Clinica

Telefono 0245498282 int. 205

ABBREVIAZIONI

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

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

LINEE GUIDA PER LA VALUTAZIONE STATISTICA

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

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

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

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

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

Risultati: se non già riportato nei metodi, descrivere la dimensione campionaria totale e quella dei sottogruppi in cui è stata effettuata l'analisi statistica. È necessario, inoltre, riportare il numero di soggetti in ogni fase dello studio (soggetti inclusi, esclusi, randomizzati, assegnati ai vari trattamenti, persi) (1). Indicare numeratore e denominatore per le frequenze relative e/o percentuali e per i rapporti calcolati. Le frequenze relative devono essere riportate con 2 cifre significative (ad esempio 0,37; 0,026); le percentuali non devono essere espresse con più di un decimale e non devono essere utilizzate per piccoli campioni ($N < 10$). Se le osservazioni sono state suddivise in classi, occorre specificare chiaramente a quale classe appartengono il limite inferiore e superiore di ogni classe. Generalmente, le statistiche descrittive richiedono una cifra aggiuntiva rispetto a quelle utilizzate per i dati grezzi. Dati distribuiti normalmente devono essere descritti utilizzando media, DS e/o CV% ed espressi come media (DS) e non come "media \pm DS". Quando i dati non sono distribuiti normalmente, o la distribuzione è fortemente asimmetrica, occorre utilizzare la mediana e l'intervallo interquartile (25° - 75° percentile) al posto di media e DS. Se è stata utilizzata una trasformazione matematica, i calcoli delle statistiche di sintesi devono essere effettuati sui dati trasformati e poi ritrasformati nella scala originale per la presentazione (è possibile ritrasformare la media e i limiti di un intervallo ma non la deviazione standard).

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

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

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

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

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

di regressione (Deming o non parametrica di Passing-Bablok) e il diagramma di Bland-Altman (3-4).

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

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

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

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

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

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

Approfondimenti: the SAMPL Guidelines (5).

Bibliografia

1. EQUATOR Network: <https://www.equator-network.org/> (ultimo accesso: Gennaio 2021).
2. Ialongo C. Understanding the effect size and its measures. *Biochimica Medica* 2016;26:150–63.
3. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8476:307-10.
4. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R, per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "Statistica per il laboratorio. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
5. Lang TA, Altman DG. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: the "Statistical Analyses and Methods in the Published Literature" or the SAMPL Guidelines. *Int J Nurs Stud* 2015;52:5-9.

Diagnosi biochimica precoce di preeclampsia: un traguardo possibile?

Martina Zaninotto¹, Mario Plebani^{1,2}

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

²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi-Padova

“La preeclampsia, una patologia che ha una rilevante incidenza in gravidanza e che presenta complicanze potenzialmente gravi per la madre ed il feto, rappresenta una costante sfida clinica, per le sue caratteristiche di presentazione, molto variabili e per la carenza di test diagnostici accurati e precoci”. Questa affermazione presente in una raccomandazione clinica di recente pubblicazione (1), riassume una problematica che la medicina di laboratorio si trova spesso a dover affrontare: l'impossibilità di fornire un supporto tempestivo alle necessità cliniche in uno specifico ambito diagnostico.

In questa patologia, di cui sono da tempo noti gli aspetti fisiopatologici e le cause che sono alla base della sua insorgenza (2), l'unico parametro biochimico validato e tuttora utilizzato nel processo diagnostico è rappresentato dalla determinazione della proteinuria che, dal punto di vista biochimico, presenta ben note e rilevanti criticità analitiche, di armonizzazione e standardizzazione dei metodi oltre che di espressione dei risultati (3).

Assume particolare rilievo, quindi, la rassegna “Il ruolo del laboratorio nella diagnosi precoce di preeclampsia” di Montagnana M. et al (4) pubblicata in questo numero di *Biochimica Clinica*, nella quale gli autori descrivono in maniera esauriente e rigorosa lo stato dell'arte della diagnostica biochimica attuale per questa patologia. Dopo aver introdotto brevemente la definizione e la classificazione clinica della patologia e gli aspetti della diagnostica strumentale relativi, in particolare, alla misurazione della pressione arteriosa, gli autori analizzano il possibile ruolo della medicina di laboratorio nelle indagini di screening da effettuare nelle prime settimane di gravidanza e nell'identificazione delle donne a maggior rischio. Ed infatti, un ruolo preminente nella trattazione spetta ai biomarcatori angiogenici (VEGF, PlGF) ed anti-angiogenici (sFlt-1), le cui concentrazioni circolanti possono indirettamente fornire importanti informazioni sui precoci processi di sviluppo o di ipossia/ipoperfusione placentare che sono direttamente responsabili dell'insorgenza della malattia. Anche se la loro determinazione è facilmente applicabile alla pratica routinaria con l'utilizzo di metodi immunometrici, non sempre automatizzati, sono piuttosto controverse le evidenze sulla loro reale efficacia nell'identificazione di donne a maggior rischio di sviluppo di preeclampsia. Di notevole interesse sono invece i risultati che dimostrano l'elevato potere predittivo negativo del rapporto tra le due determinazioni sFlt-1/PlGF, una informazione di rilevante supporto al clinico per l'adozione di specifiche strategie di monitoraggio e terapeutiche: un basso valore del rapporto (<38) consentirebbe di escludere con una sensibilità e specificità significative (0,80 e 0,78 rispettivamente) il rischio di insorgenza di preeclampsia nella settimana successiva al prelievo. La possibilità quindi di escludere nel breve termine l'insorgenza della patologia con la conseguente decisione clinica di non procedere all'ospedalizzazione della paziente (in assenza di altri fattori di rischio) avrebbero ricadute molto efficaci dal punto di vista clinico e della sicurezza della paziente oltre che molto efficienti in termini di economia sanitaria (5). Gli aspetti positivi, tra cui la possibilità di determinazione con metodi in chemiluminescenza anche automatizzati, sarebbero parzialmente limitati, secondo gli autori, dalla mancata precocità dell'informazione fornita che, sulla base degli studi finora condotti, sarebbe accurata e clinicamente fruibile solo dopo la ventesima settimana di gravidanza.

I successivi paragrafi nei quali gli autori trattano il ruolo e le possibili informazioni di biomarcatori immunologici endocrini e di infiammazione, evidenziano una ancor più discutibile efficacia di informazione clinica: PAPP-A, Inibina A e B o AFP oltre che Proteina C Reattiva o Interleuchine, oltre a non fornire informazioni specifiche sul processo fisiopatologico in atto, non forniscono neppure informazioni sensibili e precoci. Per tale motivo, benchè noti da tempo e facilmente determinabili nella pratica routinaria, questi biomarcatori non hanno trovato interesse né collocazione nel processo diagnostico e di stratificazione del rischio.

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

Ricevuto: 22.01.2021

Revisionato: 25.01.2021

Accettato: 28.01.2021

Pubblicato on-line: 10.02.21

DOI: 10.19186/BC_2021.006

Particolarmente interessante è infine il paragrafo su marcatori biochimici innovativi quali gli acidi nucleici circolanti e i miRNA che descrive al lettore interessanti nuovi scenari. Sia nel caso degli acidi nucleici circolanti privi di cellule (di origine materna o fetale, fdNA e ffDNA rispettivamente) che dei miRNA, le rilevanti potenzialità delle informazioni biochimiche, ed in particolare la possibilità di identificare le donne a maggior rischio di sviluppo di preeclampsia (con aumentate concentrazioni circolanti di DNA libero da cellule di origine fetale, ffDNA, per probabili alterazioni placentari) oppure di identificare *“i meccanismi epigenetici come la modulazione dell’espressione dei miRNA o i processi di metilazione del DNA che possono essere implicati nella transizione della gravidanza da fisiologica a patologica”* (4) rimangono al momento attuale importanti acquisizioni biochimiche e cliniche ma di difficile applicazione alla pratica clinica routinaria. Ciononostante, come per molti altri ambiti diagnostici, queste nuove acquisizioni fisiopatologiche supportate dalle nuove tecnologie, rappresentano il futuro certo per la diagnostica biochimica di questa importante patologia.

In conclusione, come emerge dalla rassegna di Montagnana M et al, numerosi sono gli approcci ed i marcatori biochimici consolidati e di nuova introduzione che la medicina di laboratorio può adottare per supportare il clinico nella diagnostica precoce di preeclampsia come pure nell’esclusione della stessa (6): tale contributo, per essere efficace, deve essere definitivamente supportato dalle attività sanitarie ed amministrative che devono rendere richiedibili gli esami, che ne abbiano i requisiti, nella diagnostica d’urgenza senza oneri aggiuntivi a carico della paziente. Spetta quindi ai professionisti della medicina di laboratorio presentare e valorizzare le potenzialità della diagnostica biochimica descritta in termini di efficacia ed efficienza (riduzione/esclusione della ospedalizzazione, maggiore sicurezza clinica e gestionale della paziente) agli organismi di regolamentazione: il potenziale costo di alcuni dei nuovi e promettenti marcatori biochimici descritti, va valutato nel contesto di una politica sanitaria dove si considerino anche i costi indotti da diagnosi tardive o da ospedalizzazioni inutili.

Per tale motivo, è altresì auspicabile, come è avvenuto in questo caso, la condivisione e la pubblicazione di raccomandazioni congiunte tra professionisti della medicina di laboratorio e specialisti clinici per la stesura di algoritmi diagnostici e di monitoraggio a supporto dell’utilizzo delle nuove acquisizioni biochimiche nella pratica clinica routinaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on preeclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynaecol Obstet* 2019;145 Suppl 1:1-33.
2. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*. 2019;124:1094-1112
3. Morton A, Burke M, Jarvis E, et al. Changes in proteinuria and diagnosing preeclampsia in CKD pregnancy. *Pregnancy Hypertens* 2020; 20:92-5.
4. Montagnana M, Tagetti A, Fava C. Il ruolo del laboratorio nella diagnosi precoce di preeclampsia. *Biochim Clin* 2021;45:15-25.
5. Frusca T, Gervasi MT, Paolini D, et al. Budget impact analysis of sFlt-1/PIGF ratio as prediction test in Italian women with suspected preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017;30:2166-73.
6. Di Martino D, Cetin I, Frusca T et al. Italian Advisory Board: sFlt-1/PIGF ratio and preeclampsia, state of the art and developments in diagnostic, therapeutic and clinical management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;206:70-3

I Big Data e la Medicina di Laboratorio

Matteo Vidali

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

Termini come Big Data, Apprendimento Automatico (Machine Learning) e Intelligenza Artificiale (AI) suscitano reazioni contrastanti: una sostanziale indifferenza o rifiuto in chi è allergico da sempre ai concetti della statistica, dell'informatica, alle novità tecnologiche e digitali, oppure un crescente interesse in chi è convinto di poter utilizzare questi strumenti per apportare valore in differenti ambiti, come quello sanitario e della ricerca scientifica, nell'area del marketing e della produzione industriale, nel settore finanziario e bancario, con numerose applicazioni e potenziali benefici per la collettività. Infine, i termini possono anche suscitare una paura crescente in chi vede in questa realtà una seria minaccia alla propria privacy o perfino in chi, abituato a scenari hollywoodiani, immagina la fine della vita senziente ed il dominio dei computer sull'essere umano.

L'idea che da tale mole di informazioni possano teoricamente derivare guadagno e potere, sia economico che politico, rende ragione degli elevati investimenti tecnologici e infrastrutturali di grandi Aziende e Governi e si riflette nell'abbondanza di articoli divulgativi, nei quali i Big Data sono considerati come "l'oro di Internet", "il nuovo oro digitale" o infine "l'oro nero moderno" (1-3).

A dispetto dell'enorme interesse verso il mondo dei Big Data, permangono, tuttavia, anche tra i professionisti di differenti ambiti scientifici, numerosi fraintendimenti e opinioni contrastanti in merito a definizioni, utilizzo ed eventuali applicazioni dei Big Data.

Nell'ottica di una migliore comprensione dei Big Data e di un'ulteriore crescita professionale in ambito sanitario, non possiamo che accogliere favorevolmente la pubblicazione, su questo numero di *Biochimica Clinica*, del documento di Guerranti et al. "Introduzione ai Big Data e all'Intelligenza Artificiale in Medicina di Laboratorio" (4). In questo documento introduttivo, gli autori presentano le caratteristiche principali dei Big Data, gli strumenti di analisi e i potenziali problemi all'implementazione di questa nuova tecnologia.

Come anche sottolineato dagli stessi autori, la gestione della privacy rappresenta certamente una delle criticità più significative: l'utilizzo incrociato di basi dati multiple e di tecnologie sempre più intrusive comportano, infatti, una maggiore conoscenza e diffusione di informazioni sulla vita privata degli individui, il cui trattamento incongruo potrebbe determinare gravi danni patrimoniali e non patrimoniali. Come professionisti della Sanità dobbiamo sempre ricordare che prendersi cura del paziente significa anche prendersi cura dei suoi dati. Una tutela della privacy troppo restrittiva o rigida rischia d'altra parte di limitare grandemente il potenziale dei Big Data. L'inadeguatezza degli strumenti tradizionali di protezione dei dati ha richiesto un nuovo quadro regolatorio e nuovi strumenti per gestire il complicato rapporto tra privacy e Big Data. Tra questi vanno ricordati il Regolamento generale dell'UE sulla protezione dei dati (GDPR) del 2016 (5), le attività del progetto "T4DATA - Training for Data" finalizzati alla formazione delle autorità nazionali di controllo e dei responsabili per la protezione dei dati negli organismi pubblici, ed il relativo Manuale RPD, realizzato con il contributo del Garante italiano e delle altre autorità partner del progetto (6). Il GDPR consente l'applicazione delle tecniche di AI e machine learning ai dati personali, a patto che siano adottate specifiche garanzie e misure di protezione. Tuttavia, esso fornisce una guida vaga e limitata su come raggiungere questi obiettivi. Per colmare l'astrattezza delle norme del GDPR, è necessario che autorità istituzionali e di controllo forniscano una guida sufficiente per poter calare le sue prescrizioni in concretezza, proponendo soluzioni innovative e adeguate alle specifiche caratteristiche e ai metodi propri dei Big Data. Di questo stesso avviso è il recente documento "The impact of the General Data Protection Regulation (GDPR) on artificial intelligence" del "Scientific Technology Options Assessment (STOA) Panel" del Parlamento europeo, edito sotto la supervisione del prof. Giovanni Sartor dell'Istituto universitario europeo di Firenze (7).

Corrispondenza a: Matteo Vidali, Laboratorio analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Tel 0255032447, E-mail matteo.vidali@policlinico.mi.it

Ricevuto: 30.01.2021

Revisionato: 02.02.2021

Accettato: 03.02.2021

Pubblicato on-line: 10.02.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.007

È certamente interessante interrogarsi sui principali fattori che hanno determinato l'entrata nella cosiddetta "Era dei Big Data". A tale situazione hanno certamente concorso la disponibilità di enormi quantità di dati registrati e facilmente accessibili, la ricerca e lo sviluppo di nuovi metodi statistici e algoritmi, unitamente ad un'aumentata potenza di calcolo. Tuttavia, è facile ingannarsi se si ritiene sufficiente riversare il contenuto di enormi banche dati in un supercomputer equipaggiato con complessi algoritmi per ottenere informazioni significative: i computer, più facilmente degli esseri umani, sono invero capaci di trovare schemi (pattern) nei dati, sono abili nel dare risposte, se correttamente programmati e interrogati, ma molto poco abili nel porre le domande giuste. È in questo spazio che l'essere umano ha un ruolo fondamentale: esso è l'unico a poter dare una direzione a dati e algoritmi.

Prepararsi a sfruttare sempre meglio queste tecnologie innovative è un dovere di chi lavora oggi nella sanità. Il professionista di Laboratorio, al fine di trasformare realmente i dati in informazioni utili per il singolo paziente, deve acquisire le necessarie competenze trasversali statistiche e informatiche, conoscere limiti, vantaggi e ambiti di applicazione di questi nuovi strumenti. Questo gli consentirà, inoltre, di essere vero interlocutore dei colleghi clinici e non già mero produttore di dati. A tal fine è indispensabile il supporto delle Società Scientifiche, che devono farsi promotori di eventi formativi e progetti scientifici multidisciplinari. A questo riguardo, e a sottolineare l'impegno costante di SIBioC nel riconoscere e nel valorizzare le nuove tecnologie e metodologie emergenti per una migliore Medicina di Laboratorio, si inserisce la recente istituzione di un nuovo Gruppo di Studio intersocietario "Big Data e Intelligenza Artificiale" tra SIBioC, l'Associazione Italiana Sistemi Informativi in Sanità (ISIS) ed Elas Italia. In questo contesto è augurabile che a questo primo articolo sull'argomento (4) altri ne seguano sulla rivista della Società per sollecitare un vivace e proficuo dibattito sul tema.

Le parole pronunciate da Antonio Scala, presidente della Big Data in Health Society, all'apertura della terza edizione della conferenza "*Big Data in Health*" del 2019 sono chiarificatrici sulla direzione da prendere: "*I dati sono il nostro nuovo oro. Per beneficiarne dobbiamo sapere come estrarlo, raffinarlo e lavorarlo, mettendo insieme competenze multiple e creatività*".

BIBLIOGRAFIA

1. Tiraboschi M. Algoritmi e big data entrano nelle aziende: ora il tema è da contratto. Il Sole 24 ore – 29 novembre 2017. Consultabile al sito <https://www.ilssole24ore.com/> (ultimo accesso: gennaio 2021).
2. Jiang M, Fu KW. Chinese Social Media and Big Data: Big Data, Big Brother, Big Profit? Policy Internet 2018;10:372-92.
3. Conrad V. Digital Gold: Cybersecurity Regulations and Establishing the Free Trade of Big Data. Wm & Mary Bus L Rev. 2018;10:295-336. Consultabile al sito <https://scholarship.law.wm.edu/wmblr/vol10/iss1/7> (ultimo accesso: gennaio 2021).
4. Guerranti R, Padoan A, Angeletti D et al. per il Gruppo di Studio SIBioC-Associazione Italiana Sistemi Informativi in Sanità (AISIS) "Big Data e Intelligenza Artificiale". Introduzione ai Big Data e all'Intelligenza Artificiale in Medicina di Laboratorio. Biochim Clin 2021;45:57-67.
5. Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation). Consultabile al sito <https://eur-lex.europa.eu/> (ultimo accesso: gennaio 2021).
6. Manuale RPD. Linee guida destinate ai Responsabili della protezione dei dati nei settori pubblici e parapubblici per il rispetto del Regolamento generale sulla protezione dei dati dell'Unione Europea. Consultabile al sito <https://www.garanteprivacy.it/> (ultimo accesso: gennaio 2021).
7. Panel for the Future of Science and Technology (STOA) – European Parliament. The impact of the General Data Protection Regulation (GDPR) on artificial intelligence. Consultabile al sito <https://www.europarl.europa.eu/stoa/en/home/highlights> (ultimo accesso: gennaio 2021).

Il ruolo del laboratorio clinico nella diagnosi precoce di preeclampsia

Martina Montagnana¹, Angela Tagetti², Cristiano Fava²

¹Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento Università di Verona

²Sezione di Medicina Interna C, Dipartimento di Medicina, Università di Verona

ABSTRACT

The role of the clinical laboratory in the early diagnosis of preeclampsia.

Hypertensive pregnancy disorders include a large spectrum of conditions, including pre-existing chronic hypertension, gestational hypertension, preeclampsia (PE) and eclampsia. In particular, PE is one of the most important causes of maternal morbidity and mortality and perinatal death, preterm birth, and delayed intrauterine growth. The studies support a pathogenetic model of insufficient placentation which results in a vicious circle clinically dominated by an increase in blood pressure and proteinuria in the first phase, and by the involvement of the central nervous system up to convulsions in the more advanced stages. A crucial aspect of patient management is therefore represented by the identification of biological markers measurable in maternal blood (circulating) useful in the diagnosis, prognostic stratification and monitoring. In particular, in recent years many resources have been used to identify a biophysical and biochemical screening test aimed at identifying women at greater risk of PE, but none of these tools when used alone has demonstrated a significant predictive value. Few biomarkers are currently used in clinical practice. The analysis of the literature suggests that angiogenic and anti-angiogenic molecules, in particular the fms-like-tyrosine-kinase receptor 1 and placental growth factor (sFlt-1/PlGF) ratio, can be considered the biomarkers with the best diagnostic performance in the second trimester of pregnancy. However, doubts remain about their use in clinical practice before the 20th gestational week.

CLASSIFICAZIONE E DEFINIZIONE DEI DISTURBI IPERTENSIVI DELLA GRAVIDANZA

I disturbi ipertensivi della gravidanza [ipertensione preesistente, ipertensione gestazionale, preeclampsia (PE) ed eclampsia] (1) complicano il 10-20% delle gravidanze, sono implicati nel 20% delle morti materne e causano circa il 10% delle nascite premature (2).

L'ipertensione preesistente si riscontra in circa l'1% delle gravide e viene diagnosticata con il riscontro di pressione sistolica ≥ 140 mmHg e/o pressione diastolica ≥ 90 mmHg prima della 20^a settimana gestazionale o persistente dopo la 12^a settimana dal parto. L'ipertensione gestazionale, che si manifesta in circa il 3% delle gravidanze, viene definita come la comparsa *de novo* di ipertensione dopo la 20^a settimana gestazionale in assenza degli altri criteri di PE. La PE, che può complicare un'ipertensione gestazionale, un'ipertensione preesistente cronica o fare la sua

comparsa in una gravida in precedenza normotesa, interessa a livello mondiale il 2-8% delle donne gravide, rappresentando una delle principali cause di morbilità e mortalità sia materna sia neonatale (3).

Nel 2010, il National Institute for Health and Care Excellence (NICE) ha rilasciato una definizione di PE basata sulla presenza, dopo la 20^a settimana gestazionale, di una pressione sistolica ≥ 140 mmHg o diastolica ≥ 90 mmHg in due diverse occasioni accompagnata da proteinuria (≥ 300 mg di proteine nella raccolta urinaria delle 24 ore oppure una concentrazione proteica $\geq 1+$ nel dipstick urinario) (4). In seguito l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) ha emanato nuove linee-guida che hanno modificato in modo considerevole i criteri diagnostici (2,5). Secondo queste linee-guida la diagnosi di PE può essere posta, anche in assenza di proteinuria, sulla base della comparsa, in una donna precedentemente normotesa, di ipertensione dopo la

Corrispondenza a: Martina Montagnana, Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Piazzale Scuro, 10, 37134 - Verona, Tel 0039-045-8126698, E-mail martina.montagnana@univr.it

Ricevuto: 18.08.2020

Revisionato: 30.09.2020

Accettato: 20.10.2020

Pubblicato on-line: 14.01.2021

DOI: 10.19186/BC_2020.093

20^a settimana gestazionale associata a uno dei seguenti criteri: piastrinopenia (conta piastrinica <10⁹/L), alterata funzionalità epatica evidenziata dal raddoppio della concentrazione degli enzimi epatici, danno renale progressivo (concentrazione della creatinina sierica >1,1 mg/dL; 98 µmol/L o raddoppio della concentrazione senza evidenza di altre patologie renali), nuova insorgenza di disturbi cerebrali, visivi o edema polmonare (2,5).

Per la definizione e la diagnosi di tutte le condizioni cliniche precedentemente descritte è fondamentale la corretta e rigorosa misurazione della pressione arteriosa sia prima della gravidanza sia durante tutta la gravidanza, in modo da poter mettere in atto una corretta diagnosi differenziale (6).

La donna deve essere posta in posizione seduta, con la schiena aderente allo schienale, gli arti inferiori non incrociati e con i piedi ben appoggiati sul pavimento. La posizione distesa potrebbe infatti determinare una sottostima della pressione (7). Le donne devono astenersi dal parlare, leggere, consultare il telefono o guardare la televisione. Il braccio non dovrebbe essere allungato e deve essere posto a livello del cuore. In caso contrario, è possibile utilizzare un cuscino. La prima misurazione deve essere eseguita dopo almeno 5 minuti di posizione seduta a riposo. Il bracciale omerale non deve essere posizionato sopra i vestiti, deve essere di dimensione appropriata rispetto al diametro dell'arto e dovrebbe coprire i due terzi della distanza tra la spalla e il gomito. Il bordo inferiore del bracciale dovrebbe essere 1-2 cm sopra la piega del gomito. La pressione arteriosa deve essere misurata più volte e la prima misurazione va scartata, andando a registrare il valore medio delle due misurazioni successive ottenute con lo sfigmomanometro (6). Con i dispositivi automatici, deve essere considerata la media di due misurazioni successive a distanza di un minuto (6).

Recentemente l'International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) ha validato un punteggio di rischio per lo screening della PE (8) che prevede la misurazione della pressione arteriosa contemporaneamente su entrambi gli arti, mediante dispositivi automatici o semi-automatici validati (9) e con manicotti di dimensioni appropriate, durante il primo trimestre di gravidanza (tra l'11^a e la 13^a settimana di gestazione) in posizione seduta, con gli arti superiori posti a livello del cuore, dopo 5 minuti di riposo. Secondo questo protocollo devono essere eseguite due serie di misurazioni a intervalli di un minuto (10) e le quattro misure così ottenute vanno inserite in un calcolatore del rischio. Il calcolatore permette di ottenere automaticamente la misurazione della pressione arteriosa media finale (media di quattro serie di misurazioni) ed il calcolo del rischio specifico della paziente (10).

Scopo della presente rassegna è di descrivere lo stato dell'arte dell'utilizzo di biomarcatori circolanti per la diagnosi precoce di PE, alla luce dei risultati ottenuti nei principali studi condotti negli ultimi anni.

IL POSSIBILE RUOLO DEL LABORATORIO NELLO SCREENING DELLA PREECLAMPSIA

Lo screening della PE, cioè l'identificazione nelle prime settimane di gravidanza delle donne a rischio di sviluppare successivamente la malattia, è un aspetto cruciale per prevenire le conseguenze acute e croniche sia per la madre sia per il feto (11). L'identificazione di un biomarcatore, o di un pannello di biomarcatori circolanti, con elevate sensibilità e specificità, rappresenta una sfida per molti gruppi di ricerca a livello nazionale ed internazionale (12).

La PE è una patologia progressiva multi-sistemica caratterizzata da una placentazione anomala (13,14), disfunzione endoteliale, uno stato infiammatorio esagerato e un'alterata risposta immunitaria (11,15). È stato inoltre dimostrato che esiste una predisposizione genetica allo sviluppo di tutti i disturbi ipertensivi della gravidanza (16).

Molti sono i biomarcatori candidati e la maggior parte di questi risultano implicati nella patogenesi della PE. Si tratta di fattori angiogenici, anti-angiogenici, marcatori infiammatori, immunologici, endocrini ed epigenetici (11,17-19) (Tabella 1). Tuttavia, il limitato valore predittivo, i costi talvolta troppo elevati e la necessità di validazione in popolazioni molto ampie ne ha reso difficile l'introduzione nella pratica clinica (20,21).

Nei prossimi paragrafi verranno descritti i principali biomarcatori circolanti la cui misura effettuata prima della 20^a settimana gestazionale potrebbe trovare applicazione nella diagnosi precoce della PE.

Biomarcatori angiogenici ed anti-angiogenici

È stato ampiamente dimostrato che nella patogenesi della PE è implicata un'anomala angiogenesi placentare che causa un alterato rimodellamento delle arterie spirali materne, disfunzione placentare e ridotta perfusione (14,22). In particolare, alcuni membri della famiglia dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), tra i quali VEGF-A ed i suoi recettori, quali il recettore solubile sFlt-1, oltre al fattore di crescita placentare (PlGF), rappresentano fattori regolatori importanti sia dello sviluppo angiogenico fetale sia di quello placentare (22).

Mentre VEGF e PlGF, secreti dalla placenta prevalentemente in risposta ad ipossia tissutale o ad un danno cellulare endoteliale, agiscono come modulatori angiogenici, sFlt-1 agisce principalmente come fattore anti-angiogenico (23). sFlt-1 è prodotto dal sinciotrofoblasto e nella gravidanza fisiologica la sua concentrazione è di poco superiore a quella di PlGF (24). Tuttavia, nelle condizioni di ipossia con conseguente ipoperfusione della placenta, il trofoblasto produce quantità importanti di sFlt-1 e le concentrazioni che si possono riscontrare nel circolo materno sono notevolmente aumentate (25) assumendo un ruolo attivo nella patogenesi delle alterazioni caratteristiche della PE (26). PlGF esercita invece un effetto positivo sulla funzione placentare, ma con la progressione del danno

Tabella 1

Principali biomarcatori circolanti utilizzabili per la diagnosi precoce di preeclampsia.

	Biomarcatori circolanti
Angiogenici ed anti-angiogenici	VEGF-A, sFlt-1, PlGF, sFlt-1/PlGF
Endocrini ed immunologici	PAPP-A, PP13, hCG, AFP, activina-A, inibina-A, corina, coceptina
Infiammatori e anti-infiammatori	PCR, pentraxina-3, TNF- α , IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, omentina-1, nesfatina-1, lipossina A4, sVCAM, sICAM, TNF- α
Acidi nucleici circolanti e microRNA	cfDNA, cffDNA, microRNA (miR-210, miR-152, miR-183, miR-210, miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, miR-526a, miR-1233, miR-206, miR-23a*, miR-125b)

VEGF-A, fattore di crescita dell'endotelio vascolare-A; sFlt-1, recettore solubile FMS-simile della tirosina chinasi-1; PlGF, fattore di crescita placentare; PAPP-A, Proteina Plasmatica A associata alla gravidanza; PP13, Proteina Placentare 13; hCG, gonadotropina corionica umana; AFP, alfa fetoproteina; PCR, proteina C reattiva; TNF- α , fattore di necrosi tumorale alfa; IL, interleuchina; sVCAM, molecola di adesione cellulare vascolare solubile; sICAM, molecola di adesione cellulare intercellulare solubile; cfDNA, DNA libero da cellule materne; cffDNA, DNA fetale libero circolante; miR, microRNA.

sulle strutture trofoblastiche indotto da sFlt-1, la sua concentrazione diminuisce.

Alcuni studi hanno dimostrato che i valori circolanti dei fattori angiogenici sono significativamente più bassi nelle pazienti con PE rispetto alle gravide sane, suggerendo che una bassa concentrazione di VEGF possa essere utilizzata per identificare le gravidanze con un rischio più elevato di sviluppare PE (27-29).

In accordo, Levine et al. (30), in uno studio caso-controllo condotto misurando le concentrazioni sieriche di sFlt-1, PlGF e VEGF durante il corso della gravidanza in 120 donne nullipare sane ed in 120 donne affette da PE, hanno osservato che i livelli di PlGF misurati tra la 13^a e la 16^a settimana gestazionale risultavano significativamente più bassi nelle donne che avevano sviluppato PE rispetto alle donne con decorso fisiologico della gravidanza. Al contrario, differenze significative nelle concentrazioni di sFlt-1 erano presenti solo dopo la 33^a settimana gestazionale e VEGF rimaneva a basse concentrazioni durante tutta la gravidanza, senza mostrare differenze statisticamente significative tra casi e controlli.

Nonostante questi modulatori angiogenici e anti-angiogenici possano essere facilmente misurati utilizzando metodi immunometrici automatizzati (31,32), la loro reale utilità clinica per l'identificazione delle donne a rischio di sviluppare PE rimane ancora oggetto di dibattito (25).

Dati sicuramente interessanti sono emersi dall'utilizzo del rapporto sierico sFlt-1/PlGF, che ha mostrato un'accuratezza diagnostica (valutata come area sotto la curva, AUC) superiore a 0,90 in diversi studi osservazionali condotti su gravide nel secondo o terzo trimestre di gravidanza (33,34) o su popolazioni selezionate ad elevato rischio di PE (35-37).

Un aspetto interessante legato al rapporto sFlt-1/PlGF è il suo elevato valore predittivo negativo (PPV) e quindi una buona capacità di escludere la malattia. In

particolare, nell'ampio studio multicentrico di Zeisler et al. (33) un risultato del rapporto <38 ha permesso di escludere con elevata sensibilità (0,80) e specificità (0,78) il verificarsi di una PE nella settimana successiva (AUC 0,90) con un PPV dello 0,99. Grazie alle elevate proprietà predittive negative del marcatore è quindi possibile escludere con grande certezza lo sviluppo di una PE nelle successive 1-2 settimane.

I pochi studi prospettici che hanno esaminato il ruolo predittivo dei fattori angiogenici misurati prima della 20^a settimana gestazionale hanno prodotto risultati contraddittori (38,39).

Crovetto et al. (40), in uno studio condotto su 9 462 donne nel primo trimestre di gravidanza, hanno osservato che includendo la misurazione della concentrazione di PlGF e sFlt-1 misurati tra l'8^a e l'11^a settimana gestazionale, in algoritmi in cui erano presenti anche parametri biofisici e caratteristiche materne, l'accuratezza diagnostica migliorava. In particolare, l'AUC era 0,98 [intervallo di confidenza al 95% (95% CI) 0,97-0,99] nella diagnosi di PE precoce (prima della 32^a-34^a settimana di gestazione) e 0,87 (95% CI 0,84-0,90) nella diagnosi di PE a comparsa tardiva.

In una meta-analisi condotta su 20 studi primari che hanno valutato il rapporto sFlt-1/PlGF, Liu et al hanno ottenuto una sensibilità ed una specificità diagnostica rispettivamente di 0,78 e 0,84, con una AUC di 0,88. Nel sottogruppo con PE a comparsa precoce, l'accuratezza diagnostica è risultata migliore, raggiungendo una AUC di 0,98 (41). È importante sottolineare che la meta-analisi è stata condotta su studi che avevano incluso donne con età gestazionali diverse e non solo gravide in cui il calcolo del rapporto sFlt-1/PlGF era stato eseguito nel primo trimestre di gravidanza. Successivamente, Andersen et al, studiando in modo prospettico una coorte non selezionata di 1 909 gravide, hanno mostrato che PlGF e il rapporto sFlt-1/PlGF misurati tra la 20^a e la 34^a settimana hanno un buon valore predittivo per PE

(AUC 0,70 e 0,76, rispettivamente) e questo valore aumenta a 0,90 e 0,88 nei casi di PE grave ad esordio precoce (42). È importante anche sottolineare che sia PIGF sia il rapporto sFlt-1/PIGF non si sono dimostrati predittori significativi di PE se misurati molto precocemente, tra l'8^a e la 14^a settimana. Come evidenziato dai risultati di questi studi, i valori dei biomarcatori angiogenici sembrano non variare in modo sufficientemente precoce nelle donne con PE, per cui la loro valutazione come singoli marcatori nella prima metà della gravidanza non ha prestazioni diagnostiche accettabili per predire lo sviluppo di PE (39).

Nel 2017 sono stati pubblicati diversi studi nei quali il rapporto sFlt-1/PIGF è stato incluso in algoritmi per la predizione dello sviluppo di PE. È stato dimostrato che è possibile classificare le pazienti in base al loro rischio di sviluppare PE già all'età gestazionale di 19-24 settimane (43), e poi di confrontare i risultati a 30-34 (44) e a 35-37 settimane gestazionali (45).

In uno studio prospettico di recente pubblicazione, in cui i livelli plasmatici di PIGF sono stati misurati a partire dal secondo trimestre di gravidanza, PIGF è stato proposto come biomarcatore non solo di PE [sensibilità (Sn) 100%, specificità (Sp) 44%, PPV 39%, valore predittivo negativo (NPV) 100%] ma anche di disfunzione endoteliale, risultando patologicamente diminuito in 10 su 11 donne con gravidanze complicate (Sn 90%, PPV 100%) (46).

Il rapporto sFlt-1/PIGF misurato all'ingresso, è stato anche proposto come uno strumento utile (AUC, 0,82; 95% CI, 0,73-0,88) per predire gli eventi avversi materno-fetali (emolisi, aumento delle transaminasi, piastrinopenia, aritmie fetali) nelle PE ad insorgenza prima della 34^a settimana (47). Nello studio pubblicato quest'anno da Tasta et al, un rapporto sFlt-1/PIGF >293 all'ingresso era associato ad un aumentato rischio di complicanze [hazard ratio (HR), 3,61; 95% CI, 2,13-6,10; p<0,001] e mostrava un'associazione significativa con il tempo compreso tra la diagnosi ed il parto (HR, 2,49; 95% CI, 1,56-3,96; p<0,001) (47).

Biomarcatori endocrini ed immunologici

Durante la gravidanza fisiologica la produzione e secrezione placentare di diversi ormoni è coordinata e regolata finemente, tanto che diversi studi hanno dimostrato che bassi livelli di proteina plasmatica A associata alla gravidanza (PAPP-A) e proteina placentare 13 (PP13), così come elevati livelli di α -fetoproteina (AFP), gonadotropina corionica human (hCG), attivina-A e inibina-A, misurati nel primo trimestre di gravidanza, si associano allo sviluppo di PE (48-53). Tuttavia, l'analisi meta-analitica dei dati di otto studi, per un totale di 115 290 gravidanze, non ha permesso di identificare combinazioni di questi biomarcatori sierici con prestazioni tali da poterli suggerire come test di screening accettabile per la diagnosi precoce di PE (54). Risultati comparabili sono stati riportati da una successiva meta-analisi condotta su 103 studi che ha valutato l'accuratezza di PAPP-A, hCG, PIGF e PP13

misurati durante il primo trimestre allo scopo di predire lo sviluppo di PE e di eventi secondari quali il ritardo di crescita ed il parto pretermine (55). PIGF si è dimostrato il miglior predittore di PE, anche se con un'utilità clinica limitata.

Allen et al. hanno condotto una meta-analisi su 30 studi per un totale di 65 538 donne, con l'obiettivo di definire il ruolo diagnostico nella PE di alcuni biomarcatori (PAPP-A, PIGF, PP13, β -hCG, endoglina solubile, inibina-A, sFlt-1, p-selectina, pentraxina e VEGF) misurati nel primo trimestre di gravidanza (56). Alcuni di questi si sono dimostrati predittori significativi di PE: PAPP-A [(odds ratio (OR), 2,1; 95% CI, 1,6-2,6)], PP13 (OR, 4,4; 95% CI, 2,9-6,8), sFlt-1 (OR, 1,3; 95% CI, 2,9-6,8), pentraxina (OR, 5,3; 95% CI, 1,9-15,0) e inibina-A (OR, 3,6; 95% CI, 1,7-7,6) (56).

Un certo numero di studi caso-controllo con misurazione di PP13 tra la 5^a e la 7^a settimana gestazionale ha dimostrato che la concentrazione di questo biomarcatore può essere ridotta in modo significativo nelle donne con PE, per poi aumentare considerevolmente in parallelo alla gravità della PE (57-59). Tuttavia, in uno studio pubblicato nel 2014, Schneuer et al. hanno valutato la concentrazione di PP13 del primo trimestre in una coorte non selezionata di 2 989 gravidie, concludendo che le prestazioni diagnostiche di questo biomarcatore sono solo marginalmente utili (AUC, 0,73; 95% CI, 0,69-0,77) ai fini dello screening o della stratificazione del rischio di PE (60).

Per quanto riguarda altri biomarcatori endocrini, Illingworth et al. (61) hanno misurato i livelli circolanti materni di inibina-A, attivina-A e inibina B in tre diversi contesti clinici (donne in fase iniziale di gravidanza, dopo stimolazione del corpo luteo da hCG esogeno e in donne con gravidanza patologica e abortiva) osservando che solo l'inibina-A e l'attivina-A venivano effettivamente prodotte dal trofoblasto placentare. Al contrario, il corpo luteo ed il trofoblasto non secernono inibina B nel circolo materno. Allo scopo di valutare il ruolo diagnostico di questi biomarcatori, Muttukrishna ha condotto uno studio retrospettivo in cui la concentrazione sierica di inibina-A, inibina B, pro alfa C e attivina A è stata misurata in 20 donne con PE e in 20 donne in gravidanza fisiologica accoppiate per età, periodo gestazionale e parità (62). È interessante notare che i valori sierici di inibina A, attivina A e pro alfa C sono risultati significativamente più alti nelle donne con PE rispetto alle donne sane, mentre non è stata osservata nessuna variazione dell'inibina B. In contrasto con questi dati, Spencer et al. hanno osservato che i valori sierici di questi biomarcatori misurati in 64 donne tra l'11^a e la 14^a settimana non erano utili per l'identificazione precoce delle gravidie a rischio di sviluppare PE (63). In particolare, l'AUC era 0,64 (95% CI, 0,55-0,72) per l'inibina A e 0,59 (95% CI, 0,51-0,67) per l'attivina A, ottenendo un'efficienza diagnostica al valore soglia del 90° percentile del 20% e del 35%, rispettivamente per attivina A ed inibina A.

La corina è un enzima di conversione del peptide natriuretico atriale che promuove l'invasione da parte del

trofoblasto ed il rimodellamento dell'arteria spirale uterina (64). Dallo studio di Cui et al. sono emerse interessanti evidenze sul potenziale ruolo della corina nella patogenesi della PE (65). In particolare, è stato dimostrato che i topi gravidi carenti di corina sono inclini a sviluppare alcune caratteristiche tipiche della PE, come l'ipertensione e la proteinuria (66). Un altro aspetto importante è stata l'osservazione che i livelli sierici di mRNA della corina e le concentrazioni di proteina sono significativamente inferiori nei pazienti con PE rispetto alle gravidanze fisiologiche (65). Risultati opposti sono stati ottenuti in uno studio successivo pubblicato da Zaki et al. (67), in cui è stato dimostrato che i livelli plasmatici di corina erano significativamente più alti nelle pazienti con ipertensione indotta dalla gravidanza rispetto alle gravide sane. Ulteriori dubbi sulla potenziale utilità della corina nella PE sono emersi da uno studio nel quale le concentrazioni del marcatore sono state misurate ogni 4 settimane fino al parto in 122 donne, delle quali 85 hanno portato a termine una gravidanza fisiologica, 12 hanno sviluppato una ipertensione gestazionale, 13 una PE in fase tardiva e 12 una PE precoce (68). A differenza dei due studi precedenti, non sono state osservate differenze significative nei livelli sierici di corina tra il gruppo normoteso, le donne che hanno sviluppato ipertensione gestazionale o gli altri gruppi di donne con PE.

Più recentemente Degrelle et al. hanno dimostrato in una casistica di 181 pazienti con PE e 194 controlli, che le pazienti con PE presentano valori di corina circolante significativamente più elevati delle donne con gravidanza fisiologica e che queste concentrazioni aumentate sono dovute sia ad un aumento della produzione sia ad un aumento della secrezione da parte della placenta (69).

Analogamente alla corina, sono emersi dati controversi anche da studi che hanno misurato la copeptina, la frazione C-terminale di 39 aminoacidi della prepro-vasopressina (70). Yeung et al. hanno misurato i valori della copeptina sierica in campioni prelevati longitudinalmente durante la gravidanza in 136 controlli sani, 169 donne preeclamptiche, 92 donne con diabete mellito gestazionale, 101 con ipertensione gestazionale e 86 con parto pretermine (71), osservando che i valori di copeptina misurati alla 16^a settimana gestazionale erano associati in modo significativo al rischio di PE (OR, 1,55; 95% CI, 1,03-2,31). Tale associazione è più forte nei casi di PE diagnosticata prima della 37^a settimana (OR, 1,86; 95% CI, 1,08-3,20). Al contrario, Birdir et al. non hanno trovato alcuna differenza significativa tra i livelli di copeptina sierica misurati tra l'11^a e la 13^a settimana gestazionale in 35 donne con PE e quelli osservati in 100 gravidanze fisiologiche (72). Come per la corina, l'utilità clinica della misurazione della copeptina nell'identificazione precoce della PE rimane quindi piuttosto discutibile.

Biomarcatori infiammatori

È stato suggerito che uno dei fattori patogenetici considerati all'origine della PE possa essere

un'esagerata risposta infiammatoria materna, conseguenza di un'inadeguata invasione trofoblastica probabilmente mediata dall'interazione tra la risposta infiammatoria e l'attivazione dell'endotelio materno (73,74). In diversi studi è stato descritto come la concentrazione di un numero elevato di biomarcatori infiammatori vascolari risulti aumentata o diminuita nelle pazienti preeclamptiche rispetto alle gravide sane. Tra questi i marcatori più studiati sono stati la proteina C-reattiva (PCR), i leucociti, i neutrofili, la pentraxina-3, il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), l'interleuchina-1 beta (IL-1 beta), l'interleuchina-6 (IL-6) e l'interleuchina-8 (IL-8), oltre a biomarcatori anti-infiammatori quali l'omentina-1, la nesfatina-1 e la lipossina A4 (18,73,75-82). Nonostante sia disponibile un'ampia letteratura sull'argomento, solo pochi studi si sono occupati di valutare l'accuratezza predittiva di queste molecole nel contesto della PE con misurazioni effettuate nel primo trimestre di gravidanza.

Hamai et al. hanno misurato i livelli di IL-2 e TNF- α in 32 donne tra l'11^a e la 13^a settimana di gravidanza (75) osservando che i valori di entrambe le citochine erano significativamente più alti nelle donne che avevano sviluppato una PE rispetto a quelle che avevano avuto una gravidanza fisiologica. Utilizzando un valore soglia per IL-2 di 0,4 U/mL l'accuratezza diagnostica era 81%, mentre era del 75% al valore soglia di 7 pg/mL per il TNF- α . Nello studio di Freeman et al., in cui sono state arruolate 34 donne che hanno sviluppato una PE e 34 controlli senza complicanze accoppiati per età e parità, le concentrazioni di IL-6 non sono risultate significativamente maggiori nelle donne con PE rispetto ai controlli sani (1,58 *versus* 1,19 pg/mL, $p=0,051$) (76). Nello stesso studio, le concentrazioni di altri biomarcatori infiammatori (CRP, IL-10, sVCAM, sICAM e TNF- α) sono risultate essenzialmente sovrapponibili tra casi e controlli.

Siljee et al. utilizzando un approccio proteomico basato su un immunodosaggio multiplo per la misurazione contemporanea della concentrazione di 41 molecole, all'inizio e al termine della gravidanza, hanno osservato che solo l'IL-1 beta risultava associata in modo significativo allo sviluppo di PE (77). Diversamente dal precedente studio, in quello di Tangerås et al. (83) condotto su 548 gravide con precedenti di ipertensione gestazionale o PE, gli autori hanno dimostrato che le donne con ipertensione gestazionale avevano concentrazioni sieriche di IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-8, IL-13, fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e VEGF più alte di quelle affette da PE. Inoltre, confrontate alle gravidanze fisiologiche, le donne con PE presentavano livelli significativamente aumentati di IL-5 e IL-12 (83).

La chemerina, nota anche come responder del recettore dell'acido retinoico 2 (RARRES2), è una adipochina pro-infiammatoria che agisce reclutando ed attivando le cellule immunitarie (84). Xu et al. (85), misurando questa molecola in 518 gravide, hanno dimostrato che i livelli sierici di questo marcatore erano predittori indipendenti di PE.

Anche dopo aver escluso la presenza di patologie

infettive, la PCR misurata con metodi ad elevata sensibilità (hs-PCR) risulta aumentata nelle pazienti con PE, ed è stato dimostrato che la sua concentrazione aumenta parallelamente alla gravità della malattia (78). La PCR viene attivamente prodotta dalla placenta e rilasciata nel circolo materno (86). Kashanian et al. hanno misurato la hs-PCR tra l'8^a e la 13^a settimana gestazionale in 394 gravide (87), e hanno osservato che la concentrazione di questo biomarcatore era più alta nel gruppo di gravide con successivo sviluppo di PE (n=42) rispetto a quelle con decorso fisiologico della gravidanza (7,1±2,6 mg/L *versus* 3,6±2,3 mg/L, p=0,001). Sn, Sp, PPV, NPV e accuratezza diagnostica al valore soglia di 4 mg/L sono risultate rispettivamente 0,78, 0,72, 0,25, 0,96 e 0,73. L'utilizzo di un valore di valore soglia più alto (7 mg/L) permetteva di diagnosticare il 74% dei casi con PE severa [rischio relativo (RR), 9,3; 95% CI, 4,5-19,5]. Diversamente da questo studio, nello studio di Karinen et al. (88) non si sono osservate differenze statisticamente significative nei valori di hs-PCR misurate nel primo trimestre tra donne con PE e donne con gravidanza fisiologica.

Acidi nucleici circolanti e microRNA

Tra i nuovi approcci non invasivi per lo screening della PE, due hanno destato particolare interesse negli ultimi anni. Il primo prevede la misurazione di acidi nucleici circolanti, sia in forma di DNA libero da cellule (cfDNA), di origine materna, che DNA libero da cellule (cffDNA), di origine fetale. Il secondo approccio si basa sulla valutazione di biomarcatori epigenetici, rappresentati essenzialmente dalla misurazione dell'espressione dei microRNA (miRNA) (89-93).

Nonostante il cffDNA rappresenti solo il 2-6% del DNA circolante nel sangue materno durante la gravidanza fisiologica (94), nelle donne con PE si osserva un incremento importante che riflette probabilmente alterazioni placentari o un danno da ipoperfusione, eventi che portano ad apoptosi e necrosi delle cellule placentari (89,90). Un'altra potenziale causa di incremento dei livelli di cffDNA nel sangue materno è rappresentato da una ridotta eliminazione dal plasma materno (95).

La presenza di cffDNA nel sangue periferico materno è stata scoperta nel 1997 dal gruppo di Lo et al. (96). Due anni dopo lo stesso gruppo ha condotto uno studio finalizzato a valutare la concentrazione di cffDNA nel plasma di donne affette da PE (con età gestazionale media di 32 settimane) (97). Il ruolo del cffDNA come predittore di PE è stato confermato da studi successivi condotti su donne al secondo trimestre di gravidanza (98,99).

Nel 2014 Martin et al., analizzando in una revisione sistematica della letteratura 13 studi finalizzati a valutare l'accuratezza diagnostica del cffDNA nella PE (89), hanno affermato che la misurazione dei livelli di cffDNA è un approccio promettente per predire la PE, soprattutto delle forme precoci. Successivamente, Vlková et al. hanno ripetuto una revisione sistematica della letteratura

includendo 22 lavori (100). Sfortunatamente non può essere condotto un lavoro di meta-analisi a causa dell'ampia eterogeneità degli studi, principalmente attribuibile alle tempistiche del prelievo (compreso tra la 9^a e la 41^a settimana) e alle diverse tecniche utilizzate per la misurazione del cffDNA (101,102).

Rolnik et al. hanno misurato tra l'11^a e la 13^a e successivamente tra la 20^a e 24^a settimana i livelli di cfDNA in 20 donne con PE precoce con parto indotto prima della 34^a settimana, 20 donne affette da PE tardiva e 200 donne gravide normotese (103). Le donne con PE precoce avevano livelli di cfDNA significativamente più alti e una diminuita frazione fetale (6,8% *versus* 8,7%) rispetto alle donne normotese. In uno studio caso-controllo condotto da Kim et al. (104) su 17 casi di ipertensione gestazionale, 34 donne preeclamptiche e 84 controlli, gli autori hanno dimostrato che il modello migliore per predire la PE (AUC, 0,83; 95% CI 0,69-0,93) è rappresentato dalla combinazione della determinazione nel primo trimestre di cffDNA e della PAPP-A.

In accordo a quanto riportato nelle pubblicazioni più recenti, meccanismi epigenetici come la modulazione dell'espressione dei miRNA o processi di metilazione del DNA possono essere implicati nella transizione della gravidanza da fisiologica a patologica (105).

I miRNA sono brevi molecole non codificanti (19-24 nucleotidi) che agiscono regolando l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Dal momento che queste molecole sono stabili e possono essere misurate nei fluidi extracellulari con metodi relativamente semplici, la loro misurazione è stata studiata e proposta come biomarcatore non invasivo per la diagnosi ed il monitoraggio di molte patologie (106). Alcuni studi condotti su tessuto placentare hanno permesso di dimostrare che diversi miRNA sono espressi in modo differenziale nelle gravidanze fisiologiche e patologiche, e che i geni target di questi miRNA sono implicati nell'apoptosi e nella risposta immunitaria della patologia (107). Tra i diversi miRNA studiati e i cui livelli sono risultati aumentati o diminuiti nel siero o nel plasma delle donne con PE (91-93), uno di quelli che ha attratto maggior interesse è il miR-210, la cui espressione è aumentata sia nel tessuto placentare (108,109) sia nel siero delle pazienti, con livelli che aumentano parallelamente alla gravità della malattia (110). Per questo miR è stato dimostrato anche un ruolo patogenetico, dal momento che risulta sovra-espresso nel trofoblasto extravillioso durante il primo trimestre e sembra determinare una ridotta invasione da parte del trofoblasto con conseguente ipoperfusione uteroplacentare (111).

Li et al. hanno misurato in 32 donne con PE e in 32 gravidanze fisiologiche l'espressione sierica di diversi miRNA (miR-152, miR-182, miR-183, miR-210, miR-1, miR-328, miR-363, miR-377, miR-500 e miR-584) (112), la cui espressione tissutale placentare era risultata aumentata o diminuita in precedenti studi (107,113-116). Nello studio di Li et al. i livelli di espressione di miR-

152, miR-183 e miR-210 sono risultati aumentati nelle gravidanze complicate da PE ma solamente a partire dal secondo trimestre (112). Altri miRNA, in particolare miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525 e miR-526a sono stati riconosciuti come predittori di PE se misurati tra la 12^a e la 16^a settimana (117). MiR-1233 è risultato sovra-espresso tra la 12^a-14^a settimana di età gestazionale nello studio caso-controllo di Ura et al. eseguito su 24 donne che hanno sviluppato PE e 24 controlli (92). Al contrario, dei 754 miRNA la cui espressione è stata misurata tra l'11^a e la 14^a settimana nello studio di Luque et al., nessuno ha mostrato differenze nei livelli di espressione tra casi di PE (n=31) e controlli sani (n=44) (118). Un altro miR che è risultato espresso in modo differenziale tra casi (n=18) e controlli (n=18) sia a livello tissutale sia a livello sierico anche se solo dopo la 28^a settimana (119), è miR-206. L'unico miR espresso in modo significativamente diverso alla 16^a settimana è miR-23a*, la cui espressione è risultata ridotta nelle PE rispetto ai controlli.

Il gruppo di Licini (120) ha recentemente dimostrato un'associazione significativa tra i livelli plasmatici materni di miR-125b misurato alla 12^a settimana di gestazione e la PE. La misurazione dell'espressione di questo miR, insieme all'indice di massa corporea materna prima della gravidanza, hanno fornito un modello predittivo con un'area sotto la curva di 0,85 (95% CI, 0,70-1,00). Gli autori hanno anche dimostrato che un bersaglio di miR-125b è rappresentato da Trop-2 che si trova localizzato nella parte basale della membrana plasmatica sinciziotrofoblastica suggerendo quindi un suo ruolo nella comparsa precoce di PE (120).

Nonostante la letteratura abbia offerto negli ultimi due decenni diversi risultati promettenti, altre valutazioni dovranno essere condotte su casistiche più ampie per definire la reale utilità clinica di questi marcatori.

METODI DI MISURA E PROBLEMATICHE ANALITICHE

Molti dei marcatori biochimici descritti mostrano problematiche analitiche e organizzative che vale la pena menzionare in una revisione della letteratura destinata prevalentemente a professionisti che operano nell'ambito della Medicina di laboratorio.

Dal momento che la diagnosi o l'esclusione di PE si può collocare nell'ambito di una diagnostica d'urgenza per la decisione che il clinico deve prendere se ricoverare la paziente o semplicemente monitorarla più strettamente, è necessario che il laboratorista valuti la possibilità di implementare su piattaforme analitiche automatizzate la misurazione dei biomarcatori ritenuti utili in base alle evidenze scientifiche.

Per alcuni dei biomarcatori precedentemente descritti (ad esempio PIGF e rapporto sFit/PIGF) esistono oggi in commercio dei metodi che possono essere implementati su piattaforme completamente automatizzate, rendendoli pertanto fruibili anche in regime di emergenza/urgenza. A questo proposito, studi

di confronto su alcuni dei principali metodi automatizzati in commercio hanno mostrato caratteristiche pressoché sovrapponibili (121,122). Nello studio di McCarthy et al. in cui sono stati confrontati il metodo DELFIA Xpress PIGF 1-2-3 test, il Triage PIGF test e l'immunodosaggio Elecsys per la valutazione del rapporto sFit-1/PIGF, non sono state osservate differenze statisticamente significative per AUC, Sn, PPV, NPV, nel predire la comparsa di PE. Il test Elecsys per la determinazione del rapporto sFit-1/PIGF ha però mostrato una specificità più alta rispetto agli altri due metodi (0,93 vs. 0,80; p<0,001) (122).

Tuttavia per gli stessi biomarcatori esistono ancora in commercio metodi di misura manuali che forniscono risultati non confrontabili (123,124) e prestazioni analitiche che talvolta non raggiungono lo stato dell'arte necessario per una diagnostica biochimica così rilevante dal punto di vista clinico. Anche la concentrazione di alcune molecole infiammatorie (ad esempio sICAM e sVCAM) viene comunemente misurata utilizzando saggi ELISA non utili all'utilizzo di questi biomarcatori in regime di urgenza/emergenza in quanto non consentono di garantire le tempistiche di risposta necessarie in questo contesto clinico (125)

CONCLUSIONI

I disturbi ipertensivi della gravidanza sono associati a complicanze a breve e lungo termine sia per la madre che per il feto. Uno screening clinico e biochimico efficiente è fondamentale per mettere in atto il trattamento precoce con farmaci in grado di prevenire o ritardare la PE (quali l'acido acetilsalicilico) e ridurre quindi le complicanze materne e fetali.

La prevenzione e la diagnosi precoce della PE, anche mediante l'utilizzo di nuovi biomarcatori, pur rappresentando un investimento per il sistema sanitario, consentono di portare ad una riduzione dei costi derivanti dalle complicanze materne/fetali e dalla necessità di ricovero. Nello studio di Schlembach et al. in cui sono stati analizzati i risultati descritti in 9 pubblicazioni (126), è stata dimostrata una riduzione dei costi ed una migliore gestione delle risorse derivante dall'uso dei biomarcatori circolanti angiogenici in aggiunta alle cure standard nelle donne a rischio di sviluppare preeclampsia. Gli studi inclusi mostrano risultati simili anche se sussistono alcune differenze metodologiche.

Alcuni biomarcatori angiogenici e anti-angiogenici, in particolare il rapporto sFit/PIGF, hanno quindi dimostrato buoni risultati per la diagnosi precoce di PE, ma rimangono ancora dei dubbi sulla possibile implementazione nella pratica clinica della loro misurazione prima del 20^a settimana gestazionale.

Negli ultimi anni sono stati costruiti e proposti più di 40 modelli predittivi che includono oltre alla misurazione della concentrazione di alcuni analiti (PIGF e rapporto sFit/PIGF) esami strumentali e fattori di rischio materni, finalizzati ad identificare le donne ad alto rischio di ipertensione gestazionale e PE (127).

Uno dei metodi di screening proposti, basato sull'algoritmo della Fetal Medicine Foundation (una combinazione di fattori materni, pressione arteriosa media, indice di pulsatilità dell'arteria uterina e valori di PIGF), ha dimostrato la superiorità rispetto ai metodi di screening precedentemente raccomandati dal National Institute for Health and Care Excellence e dell'ACOG (128), raggiungendo una AUC di 0,94 (0,92-0,97) (129).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- NICE. Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. NICE Guidelines 2019 <https://www.nice.org.uk/guidance/ng133> (ultimo accesso: ottobre 2020).
- American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy: report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122:1122-31.
- Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, et al. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;170:1-7.
- www.nice.org.uk/guidance/CG107/Guidance. (ultimo accesso agosto 2020).
- ACOG Practice Bulletin No. 202 Summary: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2019;133:211-4.
- Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Circulation* 2005;111:697-716.
- Wichman K, Ryden G, Wichman M. The influence of different positions and Korotkoff sounds on the blood pressure measurements in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1984;118:25-8.
- Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynaecol Obstet* 2019;145 Suppl 1:1-33. http://www.dableducational.org/sphygmomanometers/devices_1_clinical.html#ClinTable (ultimo accesso: ottobre 2020).
- Poon LC, Zymeri NA, Zamprakou A, et al. Protocol for measurement of mean arterial pressure at 11-13 weeks' gestation. *Fetal Diagn Ther* 2012;31:42-8.
- Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Preeclampsia. *Lancet* 2010;376:631-44.
- Montagnana M, Danese E, Lippi G, et al. Blood laboratory testing for early prediction of preeclampsia: chasing the finish line or at the starting blocks? *Ann Med* 2017;49:240-53.
- Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4 Suppl):S115-22.
- Rana S, Lemoine E, Granger JP, et al. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res* 2019;124:1094-112.
- Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, et al. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;10:466-80.
- Danese E, Montagnana M, Fava C. Searching for genes involved in hypertension development in special populations: children and pre-eclamptic women. Where are we standing now? *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2253-69.
- Forest JC, Charland M, Massé J, et al. Candidate biochemical markers for screening of pre-eclampsia in early pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:973-84.
- Montagnana M, Lippi G, Albiero A, et al. Serum pro-inflammatory cytokines in physiological and pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:113-6.
- Montagnana M, Lippi G, Albiero A, et al. Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. *J Clin Lab Anal* 2009;23:88-92.
- Jadli A, Sharma N, Damania K, et al. Promising prognostic markers of preeclampsia: new avenues in waiting. *Thromb Res* 2015;136:189-95.
- Wu P, van den Berg C, Alfirevic Z, et al. Early Pregnancy Biomarkers in Pre-Eclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 2015;16:23035-56.
- Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the pathophysiological implications and clinical role of angiogenic factors in pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2015;37:81-92.
- Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, et al. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2010;37:239-53.
- Romero R, Nien JK, Espinoza J, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:9-23.
- Jardim LL, Rios DR, Perucci LO, et al. Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? *Clin Chim Acta* 2015;447:34-8.
- Eremina V, Sood M, Haigh J, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003;111:707-16.
- Lee ES, Oh MJ, Jung JW, et al. The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2007;22:94-8.
- Odibo AO, Rada CC, Cahill AG, et al. First trimester serum soluble fms-like tyrosine kinase-1, free vascular endothelial growth factor, placental growth factor and uterine artery Doppler in preeclampsia. *J Perinatol* 2013;33:670-4.
- Kurtoglu E, Avci B, Kokcu A, et al. Serum VEGF and PGF may be significant markers in prediction of severity of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:1987-92.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672-83.
- Salahuddin S, Wenger JB, Zhang D, et al. KRYPTOR-automated angiogenic factor assays and risk of preeclampsia-related adverse outcomes. *Hypertens Pregnancy* 2016;35:330-45.
- Engels T, Pape J, Schoofs K, et al. Automated measurement of sFlt1, PIGF and sFlt1/PIGF ratio in

- differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders. *Hypertens Pregnancy* 2013;32:459-73.
33. Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, et al. Predictive value of the sFlt-1:PIGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med* 2016;374:13-22.
 34. Baltajian K, Bajracharya S, Salahuddin S, et al. Sequential plasma angiogenic factors levels in women with suspected preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:89.e1-89.e10.
 35. Kim MY, Buyon JP, Guerra MM, et al. Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: results of the PROMISSE study. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214:108.e1-108.e14.
 36. Maynard SE, Crawford SL, Bathgate S, et al. Gestational angiogenic biomarker patterns in high risk preeclampsia groups. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209:53.e1-9.
 37. Powers RW, Jeyabalan A, Clifton RG, et al; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PIGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. *PLoS One* 2010;5:e13263.
 38. McElrath TF, Lim KH, Pare E, et al. Longitudinal evaluation of predictive value for preeclampsia of circulating angiogenic factors through pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:407.e1-7.
 39. Widmer M, Cuesta C, Khan KS, et al. Accuracy of angiogenic biomarkers at ≤ 20 weeks' gestation in predicting the risk of pre-eclampsia: a WHO multicentre study. *Pregnancy Hypertens* 2015;5:330-8.
 40. Crovetto F, Figueras F, Triunfo S, et al. First trimester screening for early and late preeclampsia based on maternal characteristics, biophysical parameters, and angiogenic factors. *Prenat Diagn* 2015;35:183-91.
 41. Liu Y, Zhao Y, Yu A, et al. Diagnostic accuracy of the soluble Fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio for preeclampsia: a meta-analysis based on 20 studies. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292:507-18.
 42. Andersen LB, Dechend R, Jørgensen JS, et al. Prediction of preeclampsia with angiogenic biomarkers. Results from the prospective Odense Child Cohort. *Hypertens Pregnancy* 2016;35:405-19.
 43. Litwinska M, Wright D, Efturk T, et al. Proposed clinical management of pregnancies after combined screening for preeclampsia at 19-24 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;50:367-72.
 44. Wright D, Dragan I, Syngelaki A, et al. Proposed clinical management of pregnancies after combined screening for pre-eclampsia at 30-34 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;49:194-200.
 45. Panaitescu AM, Wright D, Militello A, et al. Proposed clinical management of pregnancies after combined screening for pre-eclampsia at 35-37 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;50:383-7.
 46. Giardini V, Rovelli R, Algeri P, et al. Placental growth factor as a predictive marker of preeclampsia - PREBIO study - PREeclampsia BIOchemical study [published online ahead of print, 2020 Jul 20]. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;1-7. doi:10.1080/14767058.2020.1792878.
 47. Tasta O, Parant O, Hamdi SM, et al. Evaluation of the Prognostic Value of the sFlt-1/PIGF Ratio in Early-Onset Preeclampsia [published online ahead of print, 2020 May 23]. *Am J Perinatol* 2020 doi:10.1055/s-0040-1709696.
 48. Spencer K, Cowans N, Nicolaides K. Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of preeclampsia. *Prenat Diagn* 2008;28:7-10.
 49. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, et al. First trimester maternal PAPP-A and free beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population based screening study (The FaSTER trial). *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1446-51.
 50. Bersinger NA, Smarason AK, Muttukrishna S, et al. Women with pre-eclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin-A, activin-A and soluble E-selectin. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:45-55.
 51. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, et al. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, pre-eclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1762-7.
 52. Muttukrishna S, North RA, Morris J, et al. Serum inhibin-A and activin-A are elevated prior to the onset of pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000;15:1640-5.
 53. Ree PH, Hahn WB, Chang SW, et al. Early detection of pre-eclampsia using inhibin-A and other second-trimester serum markers. *Fetal Diagn Ther* 2011;29:280-6.
 54. Hui D, Okun N, Murphy K, et al. Combinations of maternal serum markers to predict preeclampsia, small for gestational age, and stillbirth: a systematic review. *J Obstet Gynaecol Can* 2012;34:142-53.
 55. Zhong Y, Zhu F, Ding Y. Serum screening in first trimester to predict pre-eclampsia, small for gestational age and preterm delivery: systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2015;15:191.
 56. Allen RE, Rogozinska E, Cleverly K, et al. Abnormal blood biomarkers in early pregnancy are associated with preeclampsia: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;182:194-201.
 57. Huppertz B, Sammar M, Chefetz I, et al. Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of pre-eclampsia. *Fetal Diagn Ther* 2008;24:230-6.
 58. Gonen R, Shahar R, Grimpel YI, et al. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: A prospective longitudinal study. *BJOG* 2008;115:1465-72.
 59. Chafetz I, Kuhnreich I, Sammar M, et al. First-trimester placental protein 13 screening for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:35 e1-e7.
 60. Schneuer FJ, Nassar N, Khambalia AZ, et al. First trimester screening of maternal placental protein 13 for predicting preeclampsia and small for gestational age: in-house study and systematic review. *Placenta* 2012;33:735-40.
 61. Illingworth PJ, Groome NP, Duncan WC, et al. Measurement of circulating inhibin forms during the establishment of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1471-5.
 62. Muttukrishna S, Knight PG, Groome NP, et al. Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for pre-eclampsia. *Lancet* 1997;349:1285-8.
 63. Spencer K, Cowans NJ, Nicolaides KH. Maternal serum inhibin-A and activin-A levels in the first trimester of pregnancies developing pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:622-6.
 64. Wang Z, Wang Z, He M, et al. Krüppel-like factor 17 upregulates uterine corin expression and promotes spiral artery remodeling in pregnancy [published online ahead of print, 2020 Jul 27]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 doi:10.1073/pnas.2003913117.
 65. Cui Y, Wang W, Dong N, et al. Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature* 2012;484:246-50.

66. Chan JC, Knudson O, Wu Fet al. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:785e790.
67. Zaki MA, El-Banawy SE-DS, El-Gammal HH. Plasma soluble corin and N-terminal pro- atrial natriurectic peptide levels in pregnancy induced hypertension. *Pregnancy Hypertens* 2012;2:48-52.
68. Khalil A, Maiz N, Garcia-Mandujano R, et al. Longitudinal changes in maternal corin and mid-regional proatrial natriuretic peptide in women at risk of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:190-8.
69. Degrelle SA, Chissey A, Stepanian A, et al. Placental Overexpression of Soluble CORIN in Preeclampsia. *Am J Pathol* 2020;190:970-6.
70. Holwerda DA. A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries. I. Isolation and characterization, *Eur J Biochem* 1972;28:334-9.
71. Yeung EH, Liu A, Mills JL, et al. Increased levels of copeptin before clinical diagnosis of preelcampsia. *Hypertension* 2014;64:1362-7.
72. Birdir C, Janssen K, Stanescu AD, et al. Maternal serum copeptin, MR-proANP and procalcitonin levels at 11-13 weeks gestation in the prediction of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292:1033-42.
73. Can M, Sancar E, Harma M, et al. Inflammatory markers in preeclampsia patients. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1469-72.
74. Mihiu D, Razvan C, Malutan A, et al. Evaluation of maternal systemic inflammatory response in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2015;54:160-6.
75. Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, et al. Evidence for an elevation in serum IL-2 and tumour necrosis factor-alpha levels before the clinical manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:89-93.
76. Freeman DJ, McManus F, Brown EA, et al. Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension* 2004;44:708-14.
77. Siljee JE, Wortelboer EJ, Koster MP, et al. Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester serum by bead-based multiplexed immunoassays. *Prenat Diagn* 2013;33:1183-8.
78. Hwang HS, Kwon JY, Kim MA, et al. Maternal serum highly sensitive C-reactive protein in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;98:105-9.
79. Liu H, Wu J, Wang H, et al. Association of serum omentin-1 concentrations with the presence and severity of preeclampsia. *Ann Clin Biochem* 2015;52(Pt 2):245-50.
80. Zhang C, Wang Y, Wang Y, et al. Decreased levels of serum nesfatin-1 in patients with preeclampsia. *Biomarkers* 2014;19:402-6.
81. Xu Z, Zhao F, Lin F, et al. Preeclampsia is associated with a deficiency of lipoxin A4, an endogenous anti-inflammatory mediator. *Fertil Steril* 2014;102:282-290.e4.
82. Cetin I, Cozzi V, Pasqualini F, et al. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1347-53.
83. Tangerås LH, Austdal M, Skråstad RB, et al. Distinct First Trimester Cytokine Profiles for Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:2478-85.
84. Roh S, Song SH, Choi KC, et al. Chemerin – a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:1013-8.
85. Xu QL, Zhu M, Jin Y, et al. The predictive value of the first-trimester maternal serum chemerin level for pre-eclampsia. *Peptides* 2014;62:150-4.
86. Malek A, Bersinger NA, Di Santo S, et al. C-reactive protein production in term human placental tissue. *Placenta* 2006;27:619-25.
87. Kashanian M, Aghbali F, Mahali N. Evaluation of the diagnostic value of the first-trimester maternal serum high-sensitivity C-reactive protein level for prediction of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1549-54.
88. Karinen L, Leinonen M, Bloigu A, et al. Maternal serum chlamydia pneumoniae antibodies and CRP levels in women with pre-eclampsia and gestational hypertension. *Hypertens Pregnancy* 2008;27:143-58.
89. Martin A, Krishna I, Badell M, et al. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenat Diagn* 2014;34:685-91.
90. Hahn S, Rusterholz C, Hosli I, et al. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta* 2011;32 Suppl:S17-20.
91. Zhao Z, Moley KH, Gronowski AM. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem* 2013;46:953-60.
92. Ura B, Feriotto G, Monasta L, et al. Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2014;53:232-4.
93. Gunel T, Zeybek YG, Akçakaya P, et al. Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet Mol Res* 2012;10:4034.
94. Lo ES, Lo YM, Hjelm NM, et al. Transfer of nucleated maternal cells into fetal circulation during the second trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 1998;100:605-6.
95. Lau TW, Leung TN, Chan LY, et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem* 2002;48:2141-6.
96. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
97. Lo YM, Leung TN, Tein MSC, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in pre-eclampsia. *Clin Chem* 1999;45:184-8.
98. Leung TN, Zhang J, Lau TK, et al. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001;47:137-9.
99. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:77-83.
100. Vlková B, Turňa J, Celec P. Fetal DNA in maternal plasma in preeclamptic pregnancies. *Hypertens Pregnancy* 2015;34:36-49.
101. Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, et al. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2005;51:1598-604.
102. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14753-8.
103. Rolnik DL, O'Gorman N, Fiolna M, et al. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:106-11.
104. Kim SY, Kim HJ, Park SY, et al. Early Prediction of Hypertensive Disorders of Pregnancy Using Cell-Free Fetal DNA, Cell-Free Total DNA, and Biochemical Markers. *Fetal Diagn Ther* 2016;40:255-62.
105. Januar V, Desoye G, Novakovic B, et al. Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213(4 Suppl):S182-96.

106. Larrea E, Sole C, Manterola L, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci* 2016;17.pii: E627.
107. Pineles BL, Romero R, Montenegro D. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:261 e1-6
108. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, et al. Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 2012;59:265-73.
109. Liu C, Zhou Y, Zhang Z. MiR-210: an important player in the pathogenesis of preeclampsia? *J Cell Mol Med* 2012;16:943-4.
110. Zhang Y, Fei M, Xue G, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med* 2012;16:249-59.
111. Anton L, Olarerin-George AO, Schwartz N, et al. miR-210 inhibits trophoblast invasion and is a serum biomarker for preeclampsia. *Am J Pathol* 2013;183:1437-45.
112. Li Q, Long A, Jiang L, et al. Quantification of preeclampsia-related microRNAs in maternal serum. *Biomed Rep* 2015;3:792-6.
113. Zhu XM, Han T, Sargent IL, et al. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:661.
114. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:178.
115. Noack F, Ribbat-Idel J, Thorns C, et al. miRNA expression profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded placental tissue samples from pregnancies with severe preeclampsia. *J Perinat Med* 2011;39:267-71.
116. Betoni JS, Derr K, Pahl MC, et al. MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia: Comparison of new and published results. *Hypertens Pregnancy* 2013;32:321-39.
117. Kottabova K, Doucha J, Hromadnikova I. Placental-specific microRNA in maternal circulation—identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol* 2011;89:185-91.
118. Luque A, Farwati A, Crovetto F, et al. Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy. *Sci Rep* 2014;4:4882.
119. Akehurst C, Small HY, Sharafetdinova L, et al. Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia. *J Hypertens* 2015;33:2068-74.
120. Licini C, Avellini C, Picchiassi E, et al. Pre-eclampsia predictive ability of maternal miR-125b: a clinical and experimental study. *Transl Res* 2020;S1931-5244(20)30179-1.
121. Black C, da Silva Costa F. Biomarker Immunoassays in the Diagnosis of Preeclampsia: Calculating the sFlt1/PlGF Ratio Using the Cobas®e 411 Analyser. *Methods Mol Biol* 2018;1710:9-26.
122. McCarthy FP, Gill C, Seed PT, et al. Comparison of three commercially available placental growth factor-based tests in women with suspected preterm pre-eclampsia: the COMPARE study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019;53:62-7.
123. Cowans NJ, Kisanga M, Khan A, Spencer K. A comparison of two immunoassay methods for the measurement of maternal serum placental growth factor in early pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2012;31:254-9.
124. Benton SJ, Hu Y, Xie F, et al. Angiogenic factors as diagnostic tests for preeclampsia: a performance comparison between two commercial immunoassays. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:469.e1-8.
125. Hawkins RC. Laboratory turnaround time. *Clin Biochem Rev* 2007;28:179-94.
126. Schlembach D, Hund M, Wolf C, Vatish M. Diagnostic utility of angiogenic biomarkers in pregnant women with suspected preeclampsia: A health economics review. *Pregnancy Hypertension* 2019;17:28-35.
127. Antwi E, Amoakoh-Coleman M, Vieira DL, et al. Systematic review of prediction models for gestational hypertension and preeclampsia. *PLoS One* 2020;15:e0230955.
128. Tan MY, Syngelaki A, Poon LC, et al. Screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018;52:186-95.
129. Lobo GAR, Nowak PM, Panigassi AP, et al. Validation of Fetal Medicine Foundation algorithm for prediction of preeclampsia in the first trimester in an unselected Brazilian population. *J Matern Neonatal Med* 2019;32:286-92.

I micro-RNA quali potenziali biomarcatori per la diagnosi e la prognosi del cancro del pancreas: scelte metodologiche e criticità

Ada Aita¹, Cosimo Sperti², Lucia Moletta², Cristiano De Pittà³, Caterina Millino⁴, Beniamina Pacchioni⁴, Sergio Pedrazzoli⁵, Mario Plebani¹, Daniela Basso¹

¹Dipartimento di Medicina-DIMED, Università degli Studi di Padova, e Dipartimento Strutturale Aziendale Medicina di Laboratorio, Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Padova

²Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e Gastroenterologiche-DiSCOG, Università degli Studi di Padova

³Dipartimento di Biologia-DiBio, Università degli Studi di Padova

⁴Centro di ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative (CRIBI) Università degli Studi di Padova

⁵Wirsung Onlus, Padova

Questo lavoro è stato in parte presentato al 51° Congresso Nazionale SIBioC, 20-22 Novembre 2019, Padova, nella sessione Young Scientists

ABSTRACT

Micro-RNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in pancreatic cancer: methodological choices and issues.

Pancreatic cancer is the fourth cause of the death by cancer worldwide. It remains the only cancer whose survival has not improved in the last 40 years (only 18% of patients are still alive after 1 year, and 5% after 5 years), because of the high metastatic capacity and chemoresistance of the tumour. Complete tumour resection offers a chance to improve prognosis, but only 20% of patients are suitable for surgery. Although carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) are commonly used biomarkers in clinical practice, they are not sufficiently sensitive and specific for early diagnosis neither for predicting response to treatment. The search for biomarkers for early diagnosis, post-operative surveillance and prognosis prediction is therefore fundamental in the context of pancreatic cancer.

Circulating micro-RNAs (miRNAs), emerging regulators of gene expression, have been reported by several studies as powerful non-invasive biomarkers in the pancreatic cancer setting, because of their presence and stability in human body fluids. Distinctive miRNAs expression profiles have been associated to pancreatic cancer; furthermore, changes in their expression seems to identify cancer development and response to treatment. Although many papers have been published in this field, the results are still controversial and no consensus has reached about sample type, methodologies and protocols to be adopted thus hampering their introduction into routine practice. This paper aims to summarize the methodological choices in the analysis of circulating miRNAs with particular focus on the critical points of the different phases of the process.

INTRODUZIONE

Il carcinoma del pancreas è la quarta causa di morte da cancro in tutto il mondo. Resta una delle malattie più infauste a causa dell'elevata capacità metastatica del tumore e della chemoresistenza che contribuiscono ad una prognosi sfavorevole per i pazienti (1). Il tasso di sopravvivenza è del 18% ad un anno e del 5% a 5 anni. La rimozione completa del tumore offre l'unica possibilità

di cura, ma solo il 15-20% dei pazienti è candidato per la resezione tumorale. Le fasi iniziali della malattia non sono caratterizzate da sintomi specifici, pertanto la grande maggioranza dei pazienti, al momento della diagnosi, presenta malattia metastatica avanzata ed è dunque difficile intervenire chirurgicamente. La sola chirurgia, comunque, non consente la sopravvivenza a lungo termine e gran parte dei pazienti sottoposti ai chemioterapici di prima linea non gode di miglioramenti

Corrispondenza a: Ada Aita, PhD, Biol Sci, Dipartimento di Medicina-DIMED, Università degli Studi di Padova e Dipartimento Strutturale Aziendale Medicina di Laboratorio, Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Via Giustiniani 2, 35128, Padova, Tel 0498212801, E-mail ada.aita@aopd.veneto.it

Ricevuto: 28.08.2020

Revisionato: 20.10.2020

Accettato: 30.10.2020

Pubblicato on-line: 01.03.2021

DOI: 10.19186/BC_2020.097

significativi nella prognosi. I dati di letteratura riportano tempi di sopravvivenza mediani di circa 8-10 mesi e recidiva precoce del tumore nella maggior parte dei pazienti sottoposti a resezione. Attualmente il carcinoma del pancreas resta l'unico tumore il cui tasso di sopravvivenza non è migliorato negli ultimi 40 anni (2).

Al momento, sebbene l'antigene carcinoembrionario (CEA) e l'antigene carboidratico 19-9 (CA 19-9) siano ampiamente utilizzati nella pratica clinica per la gestione dei pazienti con cancro del pancreas, questi biomarcatori non sono sufficientemente sensibili né specifici per la diagnosi precoce né per predire la sopravvivenza (3). Livelli elevati di questi biomarcatori sono anche riscontrati nel carcinoma del colon-retto e in altre condizioni quali la pancreatite, la cirrosi e la coledocolitiasi (4).

La ricerca di biomarcatori utilizzabili per la diagnosi precoce, il monitoraggio delle eventuali recidive e la predizione della prognosi è dunque fondamentale nell'ambito del cancro del pancreas.

Recentemente, numerosi studi hanno rivolto l'attenzione all'utilità diagnostica e prognostica della profilazione dei micro-RNA (miRNA) circolanti in diversi tumori maligni e in molte altre condizioni patologiche, supportando il potenziale ruolo di questa classe di biomarcatori anche nell'ambito del cancro del pancreas (5, 6).

MICRO-RNA E CANCRO DEL PANCREAS

I miRNA sono piccoli RNA endogeni non codificanti, lunghi 14-24 nucleotidi, che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, inibendo la traduzione o provocando la degradazione dell'RNA messaggero (7). I miRNA, secreti nei fluidi biologici, in particolare nel sangue, nonché nelle urine, nella saliva, nel latte materno, nei liquidi pleurici, peritoneali e cerebrospinali, sono veicolati da proteine di trasporto (8) o all'interno di vescicole membranose meglio note come esosomi (9, 10) per eludere la degradazione da parte delle RNAsi di cui sono ricchi i fluidi biologici (11, 12).

Recettori specifici sulle membrane cellulari riconoscono molecole sulla superficie degli esosomi, consentendo l'assorbimento dei miRNA e delle altre molecole trasportate all'interno. Con questo meccanismo i miRNA possono essere trasferiti da una cellula all'altra per facilitare lo scambio incrociato, la comunicazione e lo scambio di segnali (13). La lunga emivita e la stabilità dei miRNA nei fluidi biologici, la possibilità di raccogliere il campione in maniera semplice e non invasiva, rendono i miRNA, biomarcatori interessanti nella pratica clinica.

Il database miRBase (versione 22), disponibile al sito <http://www.mirbase.org/> (14) raccoglie i miRNA finora individuati. In particolare sono stati individuati 2654 miRNA umani (sequenze mature), alcuni di questi espressi costantemente in tutte le cellule, altri espressi differenzialmente in cellule diverse, altri ancora specifici di alcuni tipi cellulari; molti di questi sono stati trovati in

correlazione con il cancro. Il modello di espressione dei miRNA sembra identificare il tipo di cancro e lo stadio di malattia. Nell'ambito del cancro del pancreas moltissimi studi in letteratura riportano un ampio repertorio di miRNA circolanti associati alla diagnosi precoce, alla risposta al trattamento e alla predizione della prognosi.

Liu et al., hanno recentemente confrontato l'espressione di un pannello di miRNA (miRNA-20a, miRNA-21, miRNA-24, miRNA-25, miRNA-99a, miRNA-185 e miRNA-191) tra 197 pazienti affetti da cancro del pancreas e 158 soggetti di riferimento, dimostrando una maggiore accuratezza del pannello rispetto al CA 19-9 nel discriminare i soggetti di riferimento dai malati (rispettivamente 86,6% e 76%). L'accuratezza raggiungeva il 96,2% quando il pannello di miRNA veniva analizzato nei soli pazienti allo stadio I di malattia, rispetto ad un'accuratezza del 46,2% del CA 19-9, dimostrando l'importanza di questo pannello nella diagnosi precoce del cancro del pancreas (15). Wang et al. hanno invece dimostrato che l'analisi combinata dei miRNA-21, 210, 155 e 196a nel plasma permetteva di discriminare i pazienti con cancro del pancreas dai controlli con una sensibilità del 64% e una specificità dell'89% (16). Altri Autori hanno riportato livelli aumentati dei miRNA-16, 21, 155, 181a e b, 196a e 210 nei pazienti con cancro del pancreas rispetto, non solo a soggetti di riferimento, ma anche a pazienti con pancreatite cronica (17). Il miRNA-25 da solo è stato proposto come biomarcatore per la diagnosi precoce del cancro del pancreas in quanto la sua over-espressione è stata dimostrata in una coorte di 197 pazienti e confermata in un gruppo più numeroso di pazienti (18), mentre altri studi hanno riportato che aumentati livelli di miRNA-21 nel plasma possono essere considerati indice di progressione tumorale e prognosi peggiore nei pazienti affetti da cancro del pancreas (19). Altri Autori hanno dimostrato il ruolo di questo miRNA come biomarcatore per il monitoraggio della terapia (20). Il miR-200 è stato invece individuato come potenziale soppressore del tumore per la capacità di indurre una sotto-regolazione dei marcatori mesenchimali vimentina e zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), riducendo così la capacità del tumore di acquisire meccanismi di transizione epiteliomesenchima, noti per essere alla base dell'aggressività del tumore e della resistenza ai farmaci (21).

Altri Autori hanno poi individuato pannelli utili nella predizione della sopravvivenza. Degna di nota è la meta-analisi di Frampton et al. (22), centrata sull'espressione di miRNA in pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas sottoposti a resezione chirurgica. Al fine di valutare l'effetto dei miRNA sul tasso di sopravvivenza di questi pazienti, gli Autori hanno calcolato un indice (HR), ovvero il rischio di morte o recidiva della malattia, durante l'intervallo di studio, in tutti i pazienti che mostravano un'elevata espressione di un miRNA oncogeno rispetto a un paziente con bassa espressione, o l'opposto per un miRNA soppressore del tumore. Sono stati considerati predittori di prognosi peggiore miRNA con HR >1.

L'analisi di 20 studi e 1 525 pazienti, ha permesso di evidenziare un pannello di miRNA con variazioni dei livelli di espressione statisticamente significativi e HR >1. L'over-espressione dei miRNA-155, 203, 222, 10b e la sotto-regolazione dei miRNA-34a e 183 sono risultati essere predittori indipendenti di prognosi peggiore (22).

Sebbene i lavori pubblicati in letteratura nell'ambito del cancro del pancreas siano numerosi (1136 pubblicati negli ultimi cinque anni in riviste diverse e disponibili su PubMed digitando "miRNA and pancreatic cancer"), e i risultati dimostrano il ruolo promettente dei miRNA come biomarcatori di malattia, prognosi e trattamento, non vi è ancora consenso sulla matrice, sulle metodiche e sui protocolli da utilizzare per il loro trasferimento nella pratica clinica. Molti risultati sono tra loro contrastanti o comunque non confrontabili a causa dell'impiego di matrici diverse o metodiche diverse. Scopo dei paragrafi successivi è quello di riassumere le scelte metodologiche nell'ambito dell'analisi dei miRNA circolanti con particolare attenzione ai punti critici delle diverse fasi del processo.

ANALISI DEI MICRO-RNA CIRCOLANTI: LO STATO DELL'ARTE

La fase pre-analitica

È noto che nell'intero processo dell'esame di laboratorio, le attività che precedono l'analisi del campione e identificate come "fase pre-analitica", possono influenzare negativamente il rilascio del risultato con un tasso di errore stimato del 46-68% (23). Come per altri biomarcatori già consolidati nella pratica clinica, anche nell'ambito dell'analisi di profili di espressione dei miRNA, le variabili pre-analitiche da considerare e armonizzare per garantire la qualità del risultato appartengono a tre categorie: variabili biologiche, ambientali e tecniche.

La scelta della matrice del campione da raccogliere è fondamentale per garantire risultati confrontabili prima di intraprendere un qualsiasi studio clinico o di introdurre un esame nella routine diagnostica. Tuttavia, nell'ambito dell'analisi dei profili di espressione dei miRNA, sebbene i campioni di plasma e siero siano stati confrontati da numerosi Autori per identificare la matrice migliore, i risultati sono ancora contraddittori (11, 24-28).

Ad oggi, il plasma è considerato il campione d'elezione nello studio dei miRNA circolanti, poiché l'RNA cellulare rilasciato principalmente dalle piastrine nel siero durante il processo di coagulazione spontanea può modificare il repertorio dei miRNA circolanti. Concentrazioni più elevate di miRNA sono state, infatti, costantemente riscontrate nei sieri rispetto ai campioni di plasma (29). Tuttavia, piastrine residue sono state identificate anche nei campioni di plasma. In questo contesto, il tipo di anticoagulante e il protocollo di centrifugazione (numero di rotazioni, velocità e temperatura della rotazione) utilizzati per separare la frazione plasmatica dal sangue intero e rimuovere adeguatamente i componenti cellulari evitando la lisi

cellulare, ha un grande impatto sul repertorio di miRNA. Page et al., hanno identificato differenze significative nel 72% dei miRNA analizzati, in relazione al protocollo di separazione utilizzato (30). A questo proposito, Basso et al. raccomandano l'utilizzo di provette contenenti EDTA come anticoagulante e l'adozione di un protocollo che preveda due centrifugazioni seriali, avendo dimostrato che una doppia centrifugazione migliora la rimozione delle piastrine contaminanti rispetto ad un'unica centrifugazione del campione (31). Sebbene le principali differenze siano dovute alla contaminazione delle piastrine, nei campioni di plasma possono essere presenti anche detriti cellulari e microparticelle. Pertanto se ne raccomanda la rimozione mediante una fase di filtrazione aggiuntiva (32).

Tra gli altri anticoagulanti comunemente utilizzati nella pratica clinica, il litio-eparina dovrebbe essere evitato poiché è stato dimostrato interferire con la trascrittasi inversa (33) e gli enzimi ad attività polimerasica utilizzati nella reazione di PCR (28) riducendo significativamente i livelli di espressione dei miRNA (31). Tuttavia, qualora si volesse analizzare il profilo di espressione dei miRNA a partire da campioni già raccolti in provette contenenti litio-eparina e adeguatamente conservati, il trattamento con eparinas (34) o cloruro di litio (LiCl) (35) potrebbe garantire risultati migliori. In questo contesto, è inoltre importante conoscere e standardizzare la fase di preparazione del paziente al prelievo. È stato infatti dimostrato che l'assunzione di eparina nei casi di patologie cardiovascolari o interventi chirurgici determina la significativa riduzione della concentrazione di miRNA (27).

È inoltre sconsigliato l'utilizzo del citrato di sodio come anticoagulante, non solo perché interferisce con la quantificazione dei miRNA se valutata con tecniche di PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) (36), ma anche perché questo anticoagulante, creando un ambiente iposmotico può determinare emolisi inducendo il rilascio di miRNA confondenti e determinando un aumento fino a 50 volte della concentrazione dei miRNA (37).

Sulla base delle considerazioni sopra riportate e dei risultati dello studio condotto da Fichtlscherer et al. campioni raccolti in provette contenenti EDTA restituiscono profili di miRNA di più elevata qualità rispetto a quelli raccolti in provette contenenti eparina o sodio-citrato (38). È necessario ricordare che, nel caso in cui sia necessario prelevare più provette di sangue contenenti anticoagulanti diversi, al fine di evitare qualsiasi contaminazione, quella che contiene EDTA deve essere raccolta prima di quelle contenenti eparina o citrato.

Tuttavia, Kim et al. confrontando quattro diversi anticoagulanti, EDTA, eparina, citrato di sodio e fluoruro di sodio/ossalato di potassio (NaF/KOx), hanno dimostrato che risultati maggiormente riproducibili nella quantificazione dei miRNA sono ottenuti dall'impiego di provette contenenti NaF/KOx (28). Pertanto tali provette sarebbero da preferire nel caso di studi sui miRNA.

La scelta della matrice e della provetta non costituiscono gli unici punti critici della fase pre-analitica. È stato dimostrato che l'espressione e la concentrazione di miRNA sono influenzate anche dalle caratteristiche e dallo stato del paziente (età, sesso, indice di massa corporea, dieta, stato di digiuno, malattia, esercizio fisico, fumo e farmaci) (39- 41) e dalla qualità del campione raccolto.

Diversi studi hanno, ad esempio, dimostrato che esiste una correlazione tra la concentrazione di miRNA e la conta delle cellule del sangue (42-44). Alla luce di queste considerazioni e al fine di evitare l'emoconcentrazione, il tempo di applicazione del laccio emostatico e la postura durante il prelievo devono essere standardizzati, supportando il fatto che il prelievo di sangue deve essere eseguito secondo le linee guida (45), per poter garantire l'idoneità dei campioni raccolti.

Inoltre l'emolisi e la formazione di coaguli determinati molto spesso da un prelievo di sangue traumatico o dall'inadeguatezza delle condizioni di conservazione, trasporto e manipolazione del campione, interferiscono con i metodi spettrofotometrici utilizzati per la quantificazione dei miRNA. Per lo stesso principio, anche l'ittero e la lipemia influenzano la concentrazione di miRNA valutata con metodi spettrofotometrici, pertanto questi campioni non possono essere considerati idonei per l'analisi dell'espressione dei miRNA (34).

La quantificazione dei miRNA può inoltre essere influenzata dal volume del campione. Kim et al. hanno dimostrato che sebbene un volume plasmatico elevato garantisca una quantità sufficiente di miRNA da analizzare, questo contiene anche un eccesso di inibitori della polimerasi (emoglobina, lattoferrina e IgG) che può limitare l'accuratezza dell'analisi. Dall'altro lato, un basso volume di campione contiene pochi inibitori endogeni ma una insufficiente quantità di miRNA da analizzare. Per ovviare a questo fenomeno e rimuovere gli inibitori, sono raccomandati protocolli di estrazione che prevedono l'utilizzo di fenolo/cloroformio e l'assorbimento di silice (28).

La temperatura di conservazione è stata identificata come il fattore più rilevante nell'influenzare i profili di espressione dei miRNA nel siero. In particolare, la conservazione del campione a temperatura ambiente sembra favorire la degradazione cellulare, il rilascio di citochine e le variazioni del profilo dei miRNA nel campione di siero. Al contrario, i livelli di miRNA risultano stabili a temperatura ambiente per almeno 24 ore nei campioni di sangue intero (31). I miRNA sierici si sono invece dimostrati stabili fino a 72 ore se i campioni di siero sono refrigerati a 4° C o congelati a -20° C, a causa della riduzione dell'attività delle RNasi a temperature basse (46). Grasedieck et al. esaminando la stabilità dei miRNA dopo un lungo periodo di conservazione del campione, hanno mostrato che la quantità totale di miRNA nel siero era sufficientemente stabile per 2-4 anni a -20° C, ma risultava significativamente diminuita dopo 6 anni di

conservazione e ancora di più dopo 10 anni. Gli stessi Autori hanno anche dimostrato che ripetuti cicli di congelamento-scongelo determinano una significativa riduzione della concentrazione di miRNA rispetto alla conservazione stabile a -80° C (47).

La fase analitica

La scelta dei metodi di estrazione e amplificazione dei miRNA è fondamentale per garantire risultati robusti, affidabili e confrontabili tra loro.

Ad oggi, diversi produttori hanno sviluppato metodi di estrazione dei miRNA. I primi metodi introdotti sul mercato e più comunemente utilizzati prevedevano l'utilizzo di fenolo/cloroformio, mentre i metodi sviluppati più recentemente, che consentono un'estrazione più rapida e parzialmente automatizzata, prevedono l'assorbimento dell'RNA su una mini-colonna di silice, su biglie o su filtri in fibra di vetro. Al fine di ottimizzare la quantità e la qualità di RNA recuperato, i produttori hanno lavorato principalmente su due variabili, il volume di campione iniziale e il rapporto volume di campione/reagente di lisi. I protocolli iniziali consentivano la purificazione dei miRNA circolanti a partire da un grande volume di sangue, ma gli sforzi condotti finora hanno consentito di produrre kit commerciali che consentono l'estrazione di una quantità sufficiente di materiale per la profilazione dei miRNA a partire da un volume di sangue intero inferiore ad 1 mL. Tuttavia potrebbe essere difficile prelevare anche questo volume nel caso di bambini, anziani o pazienti oncologici (36); di conseguenza ulteriori miglioramenti in questo aspetto sono auspicabili.

È necessario sottolineare che i metodi di purificazione comunemente utilizzati (ad esempio miRNeasy®-Qiagen, Hilden, Germania o miRVana™ PARISTM-Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) sono stati progettati per isolare l'RNA totale, che include anche i miRNA e altri piccoli RNA (smallRNA). Pertanto la qualità e la composizione dell'RNA estratto possono essere molto diverse e dipendenti dal metodo utilizzato, essendo le molecole di miRNA fisicamente e chimicamente diverse dall'RNA. La questione è ulteriormente complicata dal fatto che i miRNA circolanti, per sfuggire alla degradazione delle RNasi, sono associati a proteine (ad esempio Argonaute) e alle lipoproteine o trasportati all'interno degli esosomi. In questo contesto, i metodi utilizzati per estrarre i miRNA da cellule o tessuti potrebbero non essere adatti per l'estrazione di miRNA circolanti né di miRNA esosomiali, avendo le membrane esosomiali una diversa composizione in lipidi delle membrane cellulari (48).

Il kit di estrazione deve dunque essere scelto sulla base dello scopo del test o dell'obiettivo dello studio, tuttavia kit commerciali presenti sul mercato per isolare la stessa specie di miRNA possono mostrare un'estrema variazione nella resa e nell'espressione dell'RNA. In particolare, Eldh et al. nel confrontare sette diversi metodi per l'estrazione di RNA esosomiale, hanno dimostrato che l'uso di fenolo (Trizol) puro o

combinato ad una tecnica di purificazione basata sul principio di assorbimento su colonna (miRCURY Exosome Serum/Plasma kit- Exiqon/Qiagen, Hilden Germania) si è rivelato essere tra i metodi più efficienti in termini di resa e specificità (piccoli RNA anziché RNA totali) (49). Tuttavia, sebbene il Trizol sia ampiamente impiegato, il suo uso dovrebbe essere attentamente valutato in questo contesto considerando i risultati che riportano la perdita selettiva Trizol-dipendente di pre-miRNA, piccoli RNA interferenti (siRNA) e RNA di trasporto (t-RNA) di derivazione cellulare (28).

La resa dei metodi di estrazione è fondamentale per la fase successiva del processo ovvero la scelta del metodo utilizzato per le successive analisi di espressione. Concentrazioni estremamente basse di miRNA circolanti nei campioni di plasma e siero potrebbero non soddisfare la quantità richiesta da alcune piattaforme di array di ibridazione.

Sulla base di queste considerazioni, si può concludere che la selezione del kit commerciale per l'estrazione di miRNA dovrebbe basarsi su diversi fattori: il volume iniziale disponibile o che si è in grado di prelevare, la specie di miRNA da studiare (cellulare o circolante) e il metodo di analisi dell'espressione dei miRNA.

L'analisi di espressione può inoltre essere influenzata dal metodo utilizzato per determinare la qualità e la quantità dei miRNA estratti. Sebbene il metodo spettrofotometrico (ad esempio Infinite 200 PRO Nanoquant, Tecan, Mannedorf, Svizzera; Thermo scientific NanoDrop 2000/2000C, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) sia il più comunemente usato per determinare la concentrazione e la contaminazione da proteine o fenoli, è ormai nota la sua bassa specificità e sensibilità. In dettaglio, risulta limitata la capacità di questo metodo di discriminare i miRNA dagli RNA totali e altri piccoli RNA e spesso non è in grado di rivelare la contaminazione da fenolo essendo l'assorbimento del fenolo (270 nm) molto vicina a quella degli acidi nucleici (260 nm) (50). Inoltre, poiché i miRNA extracellulari sono meno dell'1% dell'RNA totale, la loro concentrazione è spesso al di sotto dei limiti di rilevazione delle tecniche spettrofotometriche. Al fine di ovviare a questo limite metodologico, sono stati proposti negli ultimi anni nuovi metodi.

Garcia-Elias A et al. nel confrontare sei diversi metodi di quantificazione dei miRNA, hanno dimostrato che entrambi gli spettrofotometri, Infinite® 200 PRO Nanoquant (Tecan, Mannedorf, Svizzera) e NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti), sovrastimano la concentrazione dei miRNA, in quanto non discriminano tra i miRNA e contaminanti, proteine e altre molecole di RNA; al contrario, il fluorimetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) fornisce una quantificazione più accurata dei miRNA, sebbene l'RNA-seq abbia confermato che solo il 58% circa dei piccoli RNA quantificati nel plasma siano veri e propri miRNA. Infine, il kit Agilent 2100 Bioanalyzer Pico

Chip e Small Chip (Agilent, Santa Clara, California, Stati Uniti) non si sono rivelati affidabili nella quantificazione, ma hanno fornito preziose informazioni sul profilo di RNA (51). Quest'ultimo sistema, infatti, esamina la presenza di piccoli RNA tra 6 e 150 nucleotidi e determina la loro qualità assegnando un numero di integrità dell'RNA (RIN) utilizzando un algoritmo basato sulla rilevazione dell'RNA ribosomiale (52, 53). È stato dimostrato che un RIN >6 è accettabile per profilare un gran numero di miRNA da campioni di plasma e siero, al contrario un RIN <6 potrebbe indicare la presenza di miRNA degradati (54, 55). Infine, il kit Small Chip (Agilent, Santa Clara, California, Stati Uniti) non può essere utilizzato per quantificare i miRNA di derivazione esosomiale, in quanto gli RNA ribosomiali non sono rilevabili negli esosomi.

Infine, l'ultima sfida analitica è rappresentata dalla scelta della piattaforma da utilizzare per l'analisi d'espressione dei miRNA. Questa dipenderà dallo scopo del test o dall'obiettivo dello studio (analisi dell'intero miRNoma o quantificazione di specifici miRNA come biomarcatori candidati alla diagnosi o prognosi di malattia), e dovrà tener conto delle proprietà chimiche uniche dei miRNA.

I miRNA rappresentano, infatti, una quota molto piccola (circa lo 0,01%) del contenuto totale di RNA, quindi devono essere rilevati selettivamente rispetto alle altre specie di RNA presenti nel campione (37). Inoltre, la breve lunghezza dei miRNA maturi e la mancanza di una sequenza comune come una coda poli (A) che può essere utilizzata per l'arricchimento selettivo o come sito di legame, rappresentano una sfida perché i primer comunemente progettati per la trascrizione inversa e la PCR possano legarsi alla sequenza da amplificare (36, 37). Inoltre, l'elevata variabilità nel contenuto di coppie di basi azotate di guanina e citosina (GC) si riflette in un'ampia variabilità della temperatura di Melting, complicando così la standardizzazione della fase di "annealing" quando centinaia di miRNA vengono analizzati in parallelo. Infine, la sequenza altamente conservata tra membri della famiglia dei miRNA (solitamente diversi per un singolo nucleotide) e la presenza di "isomiR", che presentano piccole variazioni rispetto alla sequenza del miRNA di riferimento, rendono difficile la discriminazione di un miRNA da un altro (37).

Nonostante questi problemi, le tecniche a disposizione per profilare i miRNA sono numerose e comprendono: PCR quantitativa in tempo reale (RT-qPCR), droplet digital PCR (ddPCR), tecniche basate sull'ibridazione (come ad esempio microarrays, NanoString) e sequenziamento di nuova generazione (NGS). Moldovan et al. hanno pubblicato una interessante rassegna in merito agli aspetti metodologici, e ai vantaggi e limiti dei metodi più comunemente utilizzati (36).

In breve, gran parte dei metodi di profilazione dei miRNA, e in particolare quelli basati sulla microfluidica, sono principalmente utilizzati per l'analisi di miRNA di derivazione cellulare e tissutale a causa dell'elevato volume di campione necessario per ottenere un risultato

affidabile. Tra i metodi a disposizione, la RT-qPCR è considerata il metodo di riferimento per valutare l'espressione genica in quanto mostra una migliore sensibilità rispetto alle tecnologie array. Le piastre utilizzate per la PCR, infatti, possono ospitare un volume di RNA maggiore rispetto agli approcci precedentemente menzionati, rappresentando così la tecnica più adatta in caso di campioni contenente basse concentrazioni di miRNA (plasma, siero e altri fluidi biologici).

Più recentemente, la ddPCR è stata proposta come approccio promettente nella quantificazione assoluta dei miRNA, rivelando una maggiore precisione e una migliore riproducibilità rispetto alla RT-qPCR e avviando ai limiti dell'utilizzo di un riferimento per normalizzare la quantificazione.

Tuttavia, l'uso di RT-qPCR o ddPCR è volto alla quantificazione di un numero limitato di miRNA. Al contrario, le piattaforme di microarray sono in grado di analizzare in parallelo un gran numero di miRNA, generalmente a costi inferiori rispetto ad altri metodi di profilazione. A causa della limitata specificità dei microarrays nella quantificazione assoluta, questi sono adatti per confrontare l'espressione di miRNA tra due condizioni diverse (soggetti di riferimento *versus* malati) e individuare i miRNA differenzialmente espressi. I dati ottenuti sono poi sottoposti a validazione indipendente con metodi più specifici, generalmente RT-qPCR o ddPCR (36).

Tra tutte le tecniche disponibili ad oggi sul mercato, le piattaforme di sequenziamento Next-Generation Sequencing (NGS) sono considerate la tecnologia più promettente nel campo dell'analisi di espressione di miRNA, in quanto sono in grado non solo di rilevare miRNA già noti, ma anche nuovi miRNA e di distinguere miRNA diversi per un singolo nucleotide e isomiRs. Inoltre, rispetto alle piattaforme microarrays, l'NGS è estremamente sensibile in quanto è in grado di rilevare una copia di miRNA per cellula. Tuttavia anche l'utilizzo dell'NGS presenta alcuni svantaggi che dovrebbero essere presi in considerazione prima di introdurre questa tecnologia in una routine di laboratorio:

- è stato dimostrato che alcuni dei nuovi miRNA identificati mediante l'utilizzo dell'NGS non erano miRNA ma frammenti di RNA (37, 56) pertanto anche in questo caso si rende necessaria la validazione dei risultati mediante un metodo indipendente;
- l'NGS non è in grado di fornire una quantificazione assoluta;
- i costi per profilare i miRNA utilizzando l'NGS sono elevati;
- l'analisi e l'interpretazione dei dati richiedono un'infrastruttura computazionale avanzata e supporto bioinformatico.

La letteratura disponibile ad oggi comunque evidenzia che, nonostante gli studi sui miRNA siano in costante aumento, non vi è ancora consenso in merito alle metodiche e alle tecnologie da utilizzare per l'analisi dei miRNA circolanti, inoltre sempre più spesso emerge che l'espressione di miRNA specifici valutata con diverse piattaforme di profilazione non è comparabile.

La fase post-analitica

La fase di validazione dei risultati nell'ambito dei miRNA è strettamente legata alla fase di normalizzazione dei risultati. La normalizzazione è indispensabile per correggere eventuali distorsioni tecnico-sperimentali mantenendo invariate le differenze di espressione dei miRNA tra i gruppi studiati (tipicamente soggetti di riferimento *versus* malati). Un normalizzatore, è una molecola presente nei campioni analizzati insieme alle molecole studiate, il cui livello di espressione rimane costante in tutti i campioni analizzati e non è influenzato dal trattamento sperimentale di cui si vogliono studiare gli effetti. I livelli di espressione delle molecole di interesse sono dunque quantificati in relazione ai livelli di espressione del normalizzatore.

Alla luce di quanto sopra dunque, il normalizzatore ideale dovrebbe essere espresso costantemente e senza differenze tra i gruppi oggetto dello studio, tuttavia un normalizzatore con queste caratteristiche non è ancora stato individuato. Diversi sono i normalizzatori descritti in letteratura, sui quali però non esiste ancora consenso (57, 58). I più comunemente utilizzati sono l'U6 e il miR-16, tuttavia più autori ne hanno dimostrato l'inadeguatezza (59-62). Diversi studi hanno invece dimostrato che in assenza di un normalizzatore universale, è possibile utilizzare dei normalizzatori patologia specifica, per esempio miR-16 e miR-93 per il cancro dello stomaco (63), SNORD43 per carcinomi delle vie urinarie (64), miR-191-5p e RNU6 per il cancro del colon retto (65), o RNU91 per il cancro del pancreas (66).

Infine, è necessario ricordare che in questo ambito di fondamentale importanza per garantire l'accuratezza del risultato è la professionalità del personale. Oltre alle competenze in materia di biologia molecolare clinica sono necessarie competenze in biostatistica per l'analisi delle differenze dei profili di espressione nei diversi gruppi. Avanzati supporti bioinformatici sono inoltre necessari per molte delle tecniche analitiche menzionate.

Le variabili pre-analitiche, analitiche e post-analitiche che possono inficiare la rilevazione, la quantificazione e i livelli di espressione dei microRNA riportate nei paragrafi precedenti sono riassunte in Tabella 1.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Sebbene i miRNA costituiscano una classe di biomarcatori promettenti per la diagnosi e la prognosi del cancro del pancreas come per molte altre patologie, ad oggi non esistono ancora linee guida né consensi sui protocolli e le metodiche da adottare per l'impiego di questi nella routine diagnostica. I dati di letteratura, non solo, non sono spesso confrontabili, ma in molti casi sono addirittura tra loro discordanti. La sfida dei professionisti che lavorano in questo ambito è la condivisione delle problematiche, l'ottimizzazione dei protocolli in collaborazione con le aziende produttrici e la successiva armonizzazione.

Tabella 1

Variabili pre-analitiche, analitiche e post-analitiche che possono influire la rilevazione, la quantificazione ed i livelli di espressione dei microRNA.

Fase del processo	Variabile	Effetto sui miRNA	Raccomandazione
Fase pre-analitica	Caratteristiche e stato del paziente (età, sesso, indice di massa corporea, dieta, stato di digiuno, malattia, esercizio fisico, fumo e farmaci)	Riduzione della concentrazione dovuta all'assunzione di eparina in caso di pazienti affetti da patologie cardiovascolari o interventi chirurgici. Modificazioni della concentrazione in campioni lipemici, dovute all'interferenza con metodi spettrofotometrici di lettura della concentrazione.	Standardizzazione della popolazione valutata
	Matrice (siero o plasma)	Modificazioni del repertorio e concentrazioni più elevate nei campioni di siero legate all'RNA cellulare rilasciato in fase di coagulazione spontanea.	Campione di plasma
	Anticoagulante	Ridotte concentrazioni in caso di utilizzo di litio-eparina e sodio-citrato dovute all'interferenza su trascrittasi inversa ed enzimi ad attività polimerasica.	EDTA
	Prelievo del campione (tempo di applicazione del laccio emostatico, postura durante il prelievo, ago, volume del campione)	Modificazioni della concentrazione, se valutata con metodi spettrofotometrici, in caso di campione emolizzato, coagulato. Modificazioni del repertorio, se il volume plasmatico è elevato a causa di inibitori della polimerasi (emoglobina, lattoferrina).	Prelievo eseguito secondo linee guida
	Trasporto e conservazione	Modificazioni del repertorio, legate alla degradazione cellulare in caso di campioni di siero conservati a temperatura ambiente.	Conservazione a -80°C
	Protocollo di centrifugazione (numero di rotazioni, velocità e temperatura della rotazione)	Modificazioni del repertorio in caso di presenza di componenti e detriti cellulari.	Due centrifugazioni seriali, eventuale filtrazione per la rimozione di detriti
Fase analitica	Kit d'estrazione dei miRNA	Bassa resa o specie di miRNA selezionata (circolanti o cellulari) non adeguata per lo studio, legata alle differenti caratteristiche dei miRNA quindi dei kit di estrazione e del metodo di analisi dell'espressione.	Scelta del kit in relazione all'obiettivo dell'esame
	Determinazione di qualità e quantità dei miRNA estratti	Concentrazioni non rilevabili con metodi spettrofotometrici.	Selezione di metodi di recente introduzione sul mercato
	Metodi di analisi dell'espressione	Elevato numero di miRNA valutabili con piattaforme di microarrays ma bassa specificità nella quantificazione assoluta. Basso numero di miRNA da studiare con tecniche di RT-PCR o dd-PCR ma elevata specificità.	Scelta del metodo in relazione all'obiettivo del test
Fase post-analitica	Normalizzazione dei risultati	Assenza di un normalizzatore universale. Inadeguatezza di normalizzatori utilizzati in letteratura.	Scelta del normalizzatore in relazione all'obiettivo dello studio. Scelta di metodiche che non richiedono l'impiego di normalizzatori

miRNA: microRNA; EDTA: acido etilendiamminotetraacetico; RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction; dd-PCR: digital droplets Polymerase Chain Reaction

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67:7-30.
2. Fogel EL, Shahda S, Sandrasegaran K, et al. A Multidisciplinary approach to pancreas cancer in 2016: a review. *Am J Gastroenterol* 2017;112:537-54.
3. Lamerz R. Role of tumour markers, cytogenetics. *Ann Oncol* 1999;10 Suppl 4:145-9.
4. Galli C, Basso D, Plebani M. CA 19-9: handle with care. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1369-83.
5. Terrinoni A, Calabrese C, Basso D, et al. The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:932-53.
6. Gao Z, Jiang W, Zhang S, et al. The state of the art on blood microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019;2019:9419072.
7. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 2015;35:3-11.
8. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733-41.
9. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009;6:267-83.
10. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654-9.
11. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513-8.
12. Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* 2013;329:125-36.
13. Pontecorvi G, Bellenghi M, Puglisi R, et al. Tumor-derived extracellular vesicles and microRNAs: Functional roles, diagnostic, prognostic and therapeutic options. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020;51:75-83.
14. <http://www.mirbase.org> (ultimo accesso: marzo 2020)
15. Liu R, Chen X, Du Y, et al. Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clin Chem* 2012;58:610-8.
16. Wang J, Chen J, Chang P, et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:807-13.
17. Liu J, Gao J, Du Y, et al. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2012;131:683-91.
18. Deng T, Yuan Y, Zhang C, et al. Identification of Circulating MiR-25 as a potential biomarker for pancreatic cancer diagnosis. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:1716-22.
19. Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, et al. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2015;46:539-47.
20. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 2010;70:4528-38.
21. Li Y, VandenBoom TG 2nd, Kong D, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:6704-12.
22. Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, et al. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 2015;51:1389-404.
23. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-9.
24. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006.
25. Kavsak PA, Hammett-Stabler CA. Clinical Biochemistry year in review – the clinical “good”, the analytical “bad”, and the “ugly” laboratory practices. *Clin Biochem* 2014;47:255-6.
26. Zampetaki A, Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb Haemost* 2012;108:592-8.
27. Boeckel JN, Thome CE, Leistner D, et al. Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples. *Clin Chem* 2013;59:1125-7.
28. Kim DJ, Linnstaedt S, Palma J, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagn* 2012;14:71-80.
29. Wang K, Yuan Y, Cho JH, et al. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012;7:e41561.
30. Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One* 2013;8:e77963.
31. Basso D, Padoan A, Laufer T, et al. Relevance of pre-analytical blood management on the emerging cardiovascular protein biomarkers TWEAK and HMGB1 and on miRNA serum and plasma profiling. *Clin Biochem* 2017;50:186-93.
32. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One* 2013;8:e64795.
33. Willems M, Moshage H, Nevens F, et al. Plasma collected from heparinized blood is not suitable for HCV-RNA detection by conventional RT-PCR assay. *J Virol Methods* 1993;42:127-30.
34. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, et al. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *Biomed Res Int* 2015;2015:731479.
35. Wang Z, Yokoyama T, Chang HM, et al. Dissolution of beech and spruce milled woods in LiCl/DMSO. *J Agric Food Chem* 2009;57:6167-70.
36. Moldovan L, Batte K, Wang Y, et al. Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR. *Methods Mol Biol* 2013;1024:129-45.
37. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5:492-7.
38. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010;107:677-84.
39. Flowers E, Won GY, Fukuoka Y. MicroRNAs associated with exercise and diet: a systematic review. *Physiol Genomics* 2015;47:1-11.
40. de Boer HC, van Solingen C, Prins J, et al. Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *Eur Heart J* 2013;34:3451-7.
41. Takahashi K, Yokota S, Tatsumi N, et al. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;272:154-60.

42. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010;50:298-301.
43. Mayr B, Mueller EE, Schafer C, et al. Pitfalls of analysis of circulating miRNA: role of hematocrit. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:622-5.
44. Kappel A, Keller A. miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:636-47.
45. Simundic AM, Bolenius K, Cadamuro J, et al. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:2015-38.
46. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn* 2013;15:827-34.
47. Grasedieck S, Scholer N, Bommer M, et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia* 2012;26:2414-6.
48. Lorente A, Skotland T, Sylvanne T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:1302-9.
49. Eldh M, Lotvall J, Malmhall C, et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunol* 2012;50:278-86.
50. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995;18:62-3.
51. Garcia-Elias A, Alloza L, Puigdecanet E, et al. Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Sci Rep* 2017;7:7725.
52. Mueller O, Lightfoot S, Schröder A. RNA Integrity Number (RIN) standardization of RNA quality control. Agilent Technologies, Application Note 2004;Tech Rep 5989-1165EN. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf> (ultimo accesso: ottobre 2020)
53. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3.
54. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* 2009;4:e7405.
55. Shen J, Todd NW, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest* 2011;91:579-87.
56. Hu Y, Lan W, Miller D. Next-Generation Sequencing for MicroRNA Expression Profile. *Methods Mol Biol* 2017;1617:169-77.
57. Vigneron N, Meryet-Figuere M, Guttin A, et al. Towards a new standardized method for circulating miRNAs profiling in clinical studies: Interest of the exogenous normalization to improve miRNA signature accuracy. *Mol Oncol* 2016;10:981-92.
58. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
59. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14:844-52.
60. Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 2008;9:76.
61. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, et al. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Res Notes* 2014;7:129.
62. Ratert N, Meyer HA, Jung M, et al. Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS One* 2012;7:e39309.
63. Song J, Bai Z, Han W, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum micro-RNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 2012;57:897-904.
64. Sanders I, Holdenrieder S, Walgenbach-Brunagel G, et al. Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2012;19:1017-25.
65. Zheng G, Wang H, Zhang X, et al. Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients. *PLoS One* 2013;8:e83025.
66. Popov A, Szabo A, Mandys V. Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015;15:774.

Profilo molecolare multigenico somatico di pazienti affette da cancro ovarico sieroso ad alto grado a lunga sopravvivenza e *BRCA*-negative

Elisa De Paolis¹, Maria De Bonis¹, Marco D'Indinosante², Giovanni Scambia², Claudia Marchetti², Andrea Urbani¹, Anna Fagotti², Angelo Minucci¹

¹Laboratorio di Diagnostica Molecolare e Genomica, Unità Operativa Complessa di Chimica, Biochimica e Biologia Molecolare, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma

²Divisione di Ginecologia Oncologica, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma

Questo lavoro è stato in parte presentato al 51° Congresso Nazionale SIBioC, 20-22 Novembre 2019, Padova, nella sessione Young Scientists

ABSTRACT

Molecular profile of *BRCA*-negative long survivor High Grade Serous Ovarian Cancer patients using a somatic multigene panel.

Introduction: High Grade Serous Ovarian Cancer (HGSOC) is the most common subtype of ovarian cancer. Approximately half of HGSOCs are characterized by inactivation of Homologous Recombination (HR) genes, such as *BRCA1/2*. Given the practical certainty of recurrence in relapsed HGSOC after platinum-based chemotherapy, a maintenance approach with Poly-ADP Ribose Polymerase inhibitors (PARPi) has improved progression-free survival in *BRCA1/2* mutated patients. Besides *BRCA1/2* defects, there are no predictive biomarkers for sensitivity to platinum-based chemotherapy and PARPi. Molecular studies of *BRCA*-negative long survivor patients could be of help in identifying additional biomarkers of prolonged response.

Methods: a total of 20 fresh frozen tumor samples obtained from long survivor *BRCA*-negative HGSOC patients were investigated using a Next Generation Sequencing (NGS) multigene panel. Nucleotide variants and copy number variations of *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* and *TP53* genes were tested.

Results: in this cohort 17 mutated subjects (17/20; 85%) with 15 pathogenic/variants of unknown clinical significance (VUS) in *TP53* have been found; nucleotide variants have been identified also in *ATM* (n=1), *PALB2* (n=1), *BRIP1* (n=2), *BARD1* (n=1) and *NBN* (n=1).

Discussion: the durable response to therapy observed in our patients may be multifactorial and partially driven by germline/somatic mutations in HR genes. An extended investigation is mandatory to obtain a more comprehensive overview on the genetic status of this selected cohort of patients. Querying genes other than *BRCA1/2* would be of an extremely important benefit, allowing the clinicians to evaluate the correlation between molecular and clinical features and to acquire more appropriate genetic information useful in the eligibility to target therapy.

INTRODUZIONE

Il cancro ovarico sieroso ad alto grado (High Grade Serous Ovarian Cancer, HGSOC) rappresenta la neoplasia ginecologica a più elevata mortalità, responsabile del 70-80% di tutti i casi di decesso per cancro ovarico nel mondo (1). Tra i diversi istotipi riconducibili al tumore ovarico, l'HGSOC è associato a

maggior aggressività, capacità di metastatizzazione e prognosi sfavorevole (2). Ad oggi, la prima linea di trattamento dell'HGSOC è rappresentata dalla chirurgia citoreducente associata a chemioterapia con composti al platino. Sebbene circa il 70% delle pazienti risponda in modo favorevole alla chemioterapia iniziale, si stima che più dell'80% di queste vada incontro ad eventi di recidiva di malattia (3,4). L'elevato tasso di mortalità associato

Corrispondenza a: Elisa De Paolis, Laboratorio di Diagnostica Molecolare e Genomica, UOC di Chimica, Biochimica e Biologia Molecolare, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma, Largo A. Gemelli 1, 00168, Roma, Tel 0630154222 E-mail elisa.depaolis@policlinicogemelli.it

Ricevuto: 20.04.2020

Revisionato: 01.06.2020

Accettato: 10.06.2020

Publicato on-line: 24.11.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.070

all'HGSOC è da ricondurre anche alla diagnosi tardiva, che si accompagna ad uno stadio avanzato di progressione tumorale (5). Le pazienti con diagnosi precoce hanno una stima di sopravvivenza media a 5 anni del 55%. Nei casi in cui la diagnosi è tardiva, il tasso scende al 20% in caso di HGSOC di stadio III ed al 5% se di stadio IV (6). Tuttavia, circa il 16% delle pazienti in stadio avanzato (III-IV) mostra un'insolita prognosi favorevole legata alla buona risposta al trattamento chemioterapico (1). Le pazienti che sopravvivono per 5 (7), 7 (8) o 10 anni (2, 9-12) dopo la diagnosi di HGSOC di stadio avanzato, vengono comunemente definite "a lunga sopravvivenza" (long-term survivors). Non in tutte le pazienti con HGSOC si osserva quindi la stessa sensibilità alla chemioterapia e diventa così rilevante la possibilità di fornire a ciascuna di esse una prognosi adeguata, accompagnata da un percorso terapeutico personalizzato. Ad oggi, è difficile discriminare il raro sottogruppo di pazienti a lunga sopravvivenza e prevedere così il loro esito prognostico favorevole. In presenza di una diagnosi di HGSOC, hanno valore prognostico: l'età, lo stadio e il grado tumorale, l'istologia tumorale, la concentrazione sierica di CA125 (5) e la malattia minima residua dopo chirurgia (1, 2, 13). Diversi studi hanno in seguito dimostrato la validità prognostica di biomarcatori genetici, da soli o in combinazione con i parametri clinici (12). Dal punto di vista molecolare, deficit nel meccanismo della ricombinazione omologa (Homologous Recombination Deficiency, HRD), responsabile della riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA, sono particolarmente rilevanti nel modulare la sensibilità e la risposta alla terapia. Complessivamente, più del 50% delle pazienti HGSOC è caratterizzato da HRD mediata soprattutto da mutazioni nei geni *BRCA* (*BRCA1* e *BRCA2*) (6, 14-17). Varianti patogenetiche a penetranza minore sono state poi riportate in geni che interagiscono con le proteine *BRCA* come *BRIP1* (*BRCA1-Interacting Protein 1*), *BARD1* (*BRCA1 Associated RING Domain 1*), *CHEK2* (*Chekpoin Kinase 2*), *MRE11A* (*MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease*), *RAD50* (*human homolog of Saccharomyces cerevisiae RAD50*), *PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) e *ATM* (*ATM Serine/Threonine Kinase*) (6, 18-21). Alle pazienti *BRCA*-mutate è storicamente associata una più lunga sopravvivenza, determinata da una migliore risposta alla chemioterapia al platino ed alla terapia di mantenimento con gli inibitori della Poli-ADP Ribosio Polimerasi (PARPi, olaparib, rucaparib) (22-25). Infatti, la chemioterapia al platino cui le pazienti sono sottoposte, determina un danno massivo al DNA che si manifesta principalmente in rotture a doppio filamento. Le cellule *BRCA*-mutate sono incapaci di rispondere al danno e riparare in modo efficiente il DNA, andando incontro a morte per "letalità sintetica". La ricomparsa di malattia che si osserva dopo la buona risposta iniziale al platino è dovuta allo sviluppo di meccanismi cellulari alternativi di riparazione del DNA. Per contrastare questo meccanismo adattativo, alle

pazienti *BRCA*-mutate portatrici di mutazioni patogenetiche sia a livello germinale che somatico (26), vengono somministrati i PARPi con un miglioramento dell'outcome clinico finale (25). Tuttavia, la positività per mutazioni in *BRCA1/2* non spiega la totalità delle pazienti "a lunga sopravvivenza" (27). Sono riportati casi di pazienti *BRCA*-negative (*BRCAness*) a lunga sopravvivenza che mostrano un'eccezionale risposta alla terapia. Questo fa ipotizzare la presenza di meccanismi di HRD diversi dal più noto *BRCA* che, modulando la sensibilità al platino, determinano una prognosi migliore (25). Ad oggi manca un consenso sul corretto studio e la valutazione dello status HRD tumorale e non sono disponibili biomarcatori molecolari validati diversi da *BRCA* che indichino quali pazienti potranno beneficiare della terapia al platino e con i PARPi. Inoltre, sono pochi i dati di letteratura riguardanti le sole pazienti a lunga sopravvivenza *BRCA*-negative. Ancor meno sono gli studi che includono anche l'analisi molecolare somatica del tessuto tumorale, ormai indicata per una corretta valutazione delle pazienti con cancro ovarico (28). L'approccio multigenico di sequenziamento rappresenta il primo passo di valutazione molecolare dell'HRD, sia a livello germinale che somatico. In questo studio preliminare abbiamo selezionato pazienti *BRCA*-negative che hanno mostrato una sopravvivenza superiore a 24 mesi dopo la diagnosi di HGSOC di stadio avanzato ed attualmente in monitoraggio. A partire dal tessuto tumorale è stato effettuato il sequenziamento genico di un pannello di 12 geni coinvolti nel meccanismo dell'HRD e nella predisposizione al cancro ovarico. Scopo del lavoro è stato valutare in via esplorativa il coinvolgimento di questi geni nella sensibilità al platino *BRCA*-indipendente, valutando le possibili alterazioni genetiche di natura sia germinale che somatica.

METODI

Pazienti e campionamento

Sono state incluse nello studio un totale di 20 pazienti afferenti al Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia della Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" - IRCCS. Ciascuna paziente ha fornito un consenso informato esplicito di adesione al protocollo, condotto in accordo con quanto previsto dalla Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 2013. I criteri di selezione delle pazienti hanno incluso: diagnosi istologica di HGSOC di stadio avanzato (stadio II e III), chirurgia citoriduttiva seguita da sei cicli di chemioterapia con carboplatino e taxolo, sopravvivenza di almeno 24 mesi dalla diagnosi, analisi molecolare negativa per varianti qualitative e di "Copy Number Variation" (CNV) dei geni *BRCA1/2*, condotta sia a livello germinale che somatico (29). Le caratteristiche delle pazienti selezionate sono riportate in Tabella 1. Lo studio è stato effettuato per ciascuna paziente a partire da un campione di tessuto tumorale primitivo, congelato a -80°C fino alle successive analisi.

Tabella 1

Caratteristiche cliniche delle pazienti analizzate. La tabella indica i dati relativi alle pazienti arruolate nello studio: età alla diagnosi di cancro ovarico sieroso ad alto grado (High Grade Serous Ovarian Cancer, HGSOC); stato clinico attuale (monitoraggio/exitus); presenza di progressione di malattia; sito di recidiva di malattia; sopravvivenza dopo la diagnosi.

ID	Età alla diagnosi	Stato clinico attuale	Progressione di malattia	Sito recidiva	Sopravvivenza (mesi)
1	45	Monitoraggio	Si	Linfonodo	32
2	52	Monitoraggio	Si	Linfonodo	37
3	40	Monitoraggio	Si	Fegato e peritoneo	36
4	45	Monitoraggio	Si	Peritoneo	48
5	62	Monitoraggio	No	-	37
6	66	Exitus	Si	Peritoneo	32
7	45	Monitoraggio	Si	Peritoneo	39
8	49	Monitoraggio	Si	Peritoneo	36
9	58	Monitoraggio	Si	Peritoneo	28
10	46	Monitoraggio	Si	Peritoneo	39
11	65	Monitoraggio	Si	Peritoneo	31
12	47	Monitoraggio	Si	Linfonodo	36
13	36	Monitoraggio	Si	Peritoneo	39
14	38	Monitoraggio	No	-	36
15	46	Monitoraggio	Si	Linfonodo	35
16	47	Monitoraggio	Si	Linfonodo e peritoneo	35
17	53	Monitoraggio	No	-	35
18	73	Monitoraggio	Si	Peritoneo	31
19	76	Monitoraggio	Si	Peritoneo	27
20	54	Exitus	Si	Peritoneo	54

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire dal campione di tessuto fresco congelato mediante l'utilizzo del kit MagCore® Genomic DNA Tissue (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan) in accordo con le istruzioni del produttore. Nello specifico, il pretrattamento del campione ha previsto il taglio dello stesso fino ad ottenere una frazione di 30 mg di tessuto tumorale. Il tessuto è stato sottoposto ad omogenizzazione meccanica tramite biglie magnetiche in una soluzione contenete 20 µL di proteinasi K (10 mg/L e 400 µL di tampone lisante), in accordo con le specifiche del kit. Alla fase di incubazione di un'ora a 56°C è seguita l'estrazione automatizzata su piattaforma MagCore® HF16Plus (RBC Bioscience, New Taipei City,

Taiwan). La qualità del DNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%, mentre la quantità di DNA ottenuto è stata determinata fluorometricamente tramite Qubit (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Il DNA estratto è stato poi conservato a -20°C fino alle successive analisi.

Next Generation Sequencing

La ricerca delle varianti genetiche a partire dal DNA estratto dal tessuto fresco è stata effettuata mediante Next Generation Sequencing (NGS) (29) utilizzando il kit Devyser HBOC (Devyser, Firenze). Il pannello di geni analizzati ha incluso le regioni esoniche ed introniche fiancheggianti di 12 geni suddivisi in geni dell'HRD a penetranza moderata come *ATM* (NM_000051), *BARD1*

(NM_000465), *BRIP1* (NM_032043), *CHEK2* (NM_001005735), *NBN* (NM_002485), *PALB2* (NM_024675), *RAD51C* (NM_058216) e *RAD51D* (NM_001142571) ed altri geni di predisposizione ad alta penetranza come *CDH1* (NM_004360), *STK11* (NM_000455), *PTEN* (NM_000314) e *TP53* (NM_000546). Il protocollo di sequenziamento ha previsto due fasi di amplificazione a partire da 2 ng/ μ L di DNA. Le librerie così ottenute sono state sequenziate su piattaforma Illumina® MiSeq (Illumina, CA, US) con protocollo 2x301 cicli in "paired-end", in accordo con le istruzioni del produttore.

Analisi dei dati di sequenziamento

I dati FastQ di sequenziamento sono stati analizzati utilizzando il software dedicato AmpliconSuite (SmartSeq, Novara). Il protocollo di sequenziamento ha permesso la valutazione di varianti qualitative come "Single Nucleotide Polymorphism" (SNPs), inserzioni/delezioni di piccole dimensioni (Indels) e varianti strutturali di CNV (26). Sono state incluse nell'analisi quelle varianti con una profondità di lettura minima di 1000X e una frequenza allelica superiore al 5%. La classificazione delle varianti è stata effettuata mediante interrogazione dei principali database pubblici: LOVD (<http://www.lovd.nl/3.0/home>) (30); HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) (31); ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (32) e COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) (33). In accordo con la classificazione dell'"American College of Medical Genetics" (ACMG), le singole varianti sono state riportate come: classe 1, benigna; classe 2, potenzialmente benigna; classe 3, "Variant of Unknown Significance" (VUS); classe 4, potenzialmente patogena e classe 5, patogena. L'interpretazione della patogenicità delle varianti non riportate in letteratura è stata effettuata mediante la ricerca di studi funzionali esistenti e l'interrogazione di algoritmi disponibili online come: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>); SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) e Human Splicing Finder v3.1 (<http://www.umd.be/HSF3/>). Le pazienti con varianti di classe 4 e di classe 5 sono state considerate come portatrici di varianti patogeniche.

RISULTATI

Un gruppo selezionato di pazienti *BRCA*-negative con diagnosi di HGSOC sono state analizzate per la ricerca di varianti genetiche germinali e somatiche nei geni *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *CDH1*, *STK11*, *PTEN* e *TP53*. La totalità delle varianti riscontrate nelle pazienti è riportata nelle tabelle 2 e 3. Per ciascuna variante sono indicate le caratteristiche di annotazione (gene, posizione nella sequenza codificante ed amminoacidica di riferimento), di sequenziamento (VAF%) e di interpretazione della patogenicità sulla base dei database ClinVar e COSMIC. Complessivamente, 17 pazienti (17/20; 85%) sono

risultate portatrici di varianti a carico di uno o più geni. Nel dettaglio, sono state identificate: 11 pazienti positive per alterazioni a carico del solo gene *TP53*; 2 pazienti positive per solo uno degli altri geni del pannello (ID4, *BRIP1*; ID9, *NBN*); 4 pazienti recanti una mutazione in *TP53* associata ad una seconda alterazione in uno degli altri geni del pannello (ID3, *ATM*; ID6, *PALB2*; ID12, *BRIP1*; ID18, *BARD1*). La Tabella 2 riporta la totalità delle varianti geniche identificate in *TP53*. Queste includono 9 varianti missenso, 3 varianti non-senso e 2 varianti indel. Di queste ultime, la delezione inframe c.636_653del18 (p.Phe212_Val218del) non è riportata nei principali database mutazionali e si associa ad una predizione positiva di patogenicità. La variante missenso c.818G>A (p.Arg273His) è stata riscontrata in due pazienti (ID5; ID12). La maggior parte delle varianti di *TP53* identificate nello studio coinvolgono residui amminoacidici appartenenti al dominio proteico di legame al DNA mentre solo la variante c.273G>A (p.Trp91Ter) ricade nel dominio di transattivazione della proteina. Tutte le varianti identificate negli altri geni del pannello sono riportate nella Tabella 3. In particolare, alterazioni geniche sono state riscontrate nei geni *ATM* (ID3), *BRIP1* (ID4, ID12), *PALB2* (ID6), *NBN* (ID9) e *BARD1* (ID18). La maggior parte di queste varianti sono classificate come VUS nei principali database: *BRIP1*, c.2220G>T (p.Gln740His); *PALB2*, c.2832C>G (p.Ile944Met); *NBN*, c.1262T>C (p.Leu421Ser) e *BARD1*, c.353A>G (p.Asn118Ser). La variante identificata in *ATM* c.3925G>A (p.Ala1309Thr) è riportata in ClinVar in associazione ad un conflitto di interpretazione (ID Variant: 127377; rs149711770) con annotazioni che la descrivono come variante potenzialmente benigna e VUS. E' poi annotata come variante patogena in COSMIC (ID Variant: COSM22507) ed identificata a livello somatico in associazione a diverse tipologie di carcinomi. La valutazione bioinformatica dell'impatto della sostituzione amminoacidica (p.Ala1309Thr) sulla proteina codificante è contraddittoria, essendo associata sia a predizione positiva di patogenicità (algoritmo MutationTaster) che di neutralità (algoritmi SIFT e PolyPhen-2); tuttavia è da segnalare che non sono presenti studi funzionali al riguardo. La variante è associata ad una bassa frequenza allelica nella popolazione generale (0,068%) nel Genome Aggregation Database (https://gnomad.broadinstitute.org/variant/11-108155132-G-A?dataset=gnomad_r2_1) (34). Complessivamente, la rilevanza clinica di questa variante non è ben definita e necessita di ulteriori approfondimenti. Nella paziente ID12 è stata identificata una nuova variante in *BRIP1* (c.1049G>A, p.Cys350Tyr) cui si associa una predizione positiva di patogenicità per tutti gli algoritmi bioinformatici di predizione testati. Osservando la frequenza allelica associata a ciascuna delle 21 varianti identificate nella popolazione in analisi, si deduce che il test genetico effettuato su DNA estratto da tessuto tumorale ha permesso di identificare un numero cospicuo di varianti di origine somatica a bassa frequenza allelica (<50%) che verrebbero escluse dal

solo test germinale (8/21, 38%). Non si osserva una differente distribuzione delle varianti di *TP53* tra quelle di origine somatica (n=7) e quelle di natura presumibilmente germinale (n=8). Al contrario, la maggior parte delle varianti (5/6) identificate negli altri geni del pannello si associano ad un'alta frequenza allelica (>50%), facendo pensare ad un loro coinvolgimento a livello germinale (Tabella 2). Ad eccezione della paziente *TP53*-positiva e portatrice della nuova variante identificata in *BRIP1* (ID12), in tutte le altre pazienti la doppia positività è data da una variante di natura presumibilmente germinale e da una di natura presumibilmente somatica. Infine, l'algoritmo bioinformatico non ha identificato chiare alterazioni di CNV nelle pazienti in esame.

DISCUSSIONE

La possibilità di sottoporre le pazienti ad un trattamento terapeutico personalizzato basato sulle caratteristiche molecolari è uno dei principali obiettivi della ricerca scientifica in campo oncologico. Ad oggi, l'HGSOC ha una prognosi infausta. Tuttavia, un piccolo sottogruppo di pazienti manifesta un'efficace risposta al trattamento terapeutico con una lunga sopravvivenza dal momento della diagnosi. La valutazione di questo gruppo di pazienti fornisce l'opportunità di approfondire gli aspetti molecolari alla base della sensibilità alla terapia e può dare informazioni su nuovi biomarcatori prognostici (25,35). In questo studio è stato selezionato un gruppo di pazienti "BRCAness" affette da HGSOC

Tabella 2

Varianti identificate nel gene TP53. La tabella indica i risultati di sequenziamento ottenuti per il gene TP53 suddivisi sulla base del singolo paziente analizzato (ID). Per ciascuna variante sono indicate le informazioni di annotazione (posizione sulla sequenza codificante di riferimento, cambio amminoacidico, frequenza allelica) ed interpretazione della variante sulla base dei database ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

ID	cDNA	AA	FA%	Interpretazione	
				ClinVar	COSMIC
1	c.273G>A	p.(Trp91Ter)	64,3%	Patogenetica (rs876660548)	N/D (COSM44492)
3	c.945dupT	p.(Pro316Serfs*21)	31,6%	N/D	Patogenetica (COSM69194)
5	c.818G>A	p.(Arg273His)	16%	Patogenetica (rs28934576)	Patogenetica (COSM10660)
6	c.637C>T	p.(Arg213Ter)	66,3%	Patogenetica (rs397516436)	Patogenetica (COSM99618)
7	c.536A>G	p.(His179Arg)	10%	Potenzialmente Patogenetica (rs1057519991)	Patogenetica (COSM10889)
8	c.742C>T	p.(Arg248Trp)	44%	Patogenetica (rs121912651)	Patogenetica (COSM10656)
10	c.730G>C	p.(Gly244Arg)	23,4%	Potenzialmente Patogenetica (rs1057519989)	Patogenetica (COSM44221)
11	c.584T>C	p.(Ile195Thr)	55,4%	Patogenetica (rs760043106)	Patogenetica (COSM116924)
12	c.818G>A	p.(Arg273His)	64,4%	Patogenetica (rs28934576)	Patogenetica (COSM10660)
15	c.636_653del18	p.(Phe212_Val218del)	79,6%	N/D	N/D
16	c.814G>A	p.(Val272Met)	80,9%	Potenzialmente Patogenetica (rs121912657)	Patogenetica (COSM10891)
17	c.377A>G	p.(Tyr126Cys)	10,5%	Potenzialmente Patogenetica (rs1555526335)	Patogenetica (COSM11517)
18	c.701A>G	p.(Tyr234Cys)	10%	Potenzialmente Patogenetica (rs587780073)	Patogenetica (COSM10725)
19	c.742C>T	p.(Arg248Trp)	18,3%	Patogenetica (rs121912651)	Patogenetica (COSM10656)
20	c.438G>A	p.(Trp146Ter)	40%	Patogenetica (rs1131691026)	Patogenetica (COSM10727)

AA, Aminoacido; N/D, Non Disponibile; FA, Frequenza Allelica.

Tabella 3

Varianti identificate nei geni del pannello diversi da TP53. La tabella indica i risultati di sequenziamento ottenuti per i geni del pannello, ad esclusione di TP53, suddivisi sulla base del singolo paziente analizzato (ID). Per ciascuna variante sono indicate le informazioni di annotazione (posizione sulla sequenza codificante di riferimento, cambio amminoacidico, frequenza allelica) ed interpretazione della variante sulla base dei database ClinVar e COSMIC.

ID	Gene	cDNA	AA	FA%	Interpretazione	
					ClinVar	COSMIC
3	ATM	c.3925G>A	p.(Ala1309Thr)	54,6%	Conflitto di interpretazione (rs149711770)	Patogenetica (COSM22507)
4	BRIP1	c.2220G>T	p.(Gln740His)	50,5%	VUS (rs45589637)	N/D
6	PALB2	c.2832C>G	p.(Ile944Met)	18,4%	VUS (rs1555459704)	N/D
9	NBN	c.1262T>C	p.(Leu421Ser)	47%	VUS (rs104895032)	N/D
12	BRIP1	c.1049G>A	p.(Cys350Tyr)	78,5%	N/D	N/D
18	BARD1	c.353A>G	p.(Asn118Ser)	48,5%	VUS (rs142864491)	N/D

AA, Aminoacido; N/D, Non Disponibile; FA, Frequenza Allelica.

caratterizzate da sensibilità al platino ed una sopravvivenza di almeno 24 mesi dalla diagnosi, la maggioranza di esse attualmente in monitoraggio. Tale limite temporale è stato scelto sulla base dell'esperienza clinica maturata sulla casistica di pazienti afferenti alla Fondazione Policlinico Gemelli. La caratterizzazione molecolare è stata effettuata mediante l'analisi di 12 geni coinvolti nel meccanismo della Ricombinazione Omologae nella predisposizione al cancro ovarico. Dal punto di vista molecolare, le pazienti sono state selezionate sulla base dello status genetico di BRCA, valutato sia a livello germinale che somatico. La positività per BRCA è stata scelta come criterio di esclusione poiché è noto che le pazienti BRCA-positive, in particolare quelle recanti mutazioni in BRCA2, mostrano una maggiore sensibilità al trattamento terapeutico (1,25), mentre poco si conosce in caso di negatività. I dati di letteratura indicano che non tutte le pazienti a lunga sopravvivenza sono portatrici di mutazioni a carico di BRCA1/2, suggerendo la presenza di meccanismi molecolari aggiuntivi che caratterizzerebbero la buona risposta terapeutica (25). Analogamente a ciò che accade per difetti di funzione nelle proteine BRCA, altri difetti dell'HR possono rendere le pazienti maggiormente sensibili alla terapia iniziale ed eleggibili alla terapia personalizzata di mantenimento con i PARPi. Inoltre, la sensibilità al platino è considerata un surrogato clinico della presenza di HRD ed un indice di buona risposta alla terapia con i PARPi (19). Ciò è avvalorato dallo studio clinico inerente la somministrazione sperimentale della terapia di mantenimento con il PARPi Niraparib cui si associa una maggiore "Progression Free Survival" (PFS) sia nelle pazienti BRCA-mutate che in quelle BRCAness. Di queste, il maggior beneficio terapeutico si è osservato

nelle pazienti HRD positive (36). Studi in vitro hanno inoltre dimostrato come difetti in PALB2, ATM, CHEK1, CHEK2, NBN e RAD51D conferiscano una maggiore sensibilità ai PARPi (37-40). Nella nostra valutazione, la positività per varianti a carico di geni dell'HRD diversi da BRCA si attesta al 30%, escludendo da tale percentuale la positività per TP53. Dei 12 geni analizzati, VUS e varianti patogenetiche sono state identificate nei geni ATM, PALB2, BRIP1, BARD1 e NBN. Alterazioni in ciascuno dei geni ATM, PALB2, BARD1, NBN e BRIP1 sono state associate ad una sopravvivenza media paragonabile a quella delle portatrici di mutazioni in BRCA1/2 (27,41,42). Due delle sei pazienti positive sono risultate portatrici di varianti in BRIP1. La positività per BRIP1 si associa ad un rischio di sviluppo del cancro ovarico di tipo epiteliale del 5,8% (13, 43). In relazione al ruolo funzionale di BRIP1 nell'interazione con le proteine BRCA durante il processo di riparazione del DNA, le mutazioni in questo gene vengono associate specificatamente all'istotipo HGSOc (35,44,45). Si conferma il coinvolgimento di TP53 nel contesto molecolare dell'HGSOc, risultando mutato nella maggior parte delle pazienti. I dati emersi dall'analisi del "Cancer Genome Atlas" (TCGA) associano l'HGSOc ad un'alta instabilità cromosomica ed ad una quasi totalità di positività per mutazioni a carico di TP53 (circa il 96%). Si ipotizza che l'instabilità genomica così osservata possa essere la conseguenza dell'HRD, di cui l'alterazione di TP53 è il promotore iniziale (15). Nella nostra casistica, le mutazioni c.742C>T (p.Arg248Trp) e c.818G>A (p.Arg273His) sono riportate in letteratura come "hot spot" mutazionali di TP53 tipici del cancro ovarico (15). Varianti a carico del residuo amminoacidico Arg248 sono state associate alla sola casistica delle pazienti a lunga sopravvivenza in Yang et al. (1), mentre sono riportate

unicamente in pazienti che mostrano bassa sensibilità al platino dello studio TGCA (15). Nella valutazione di pazienti a lunga sopravvivenza sensibili alla terapia con i PARPi, Lheureux et al. hanno riportato mutazioni in *PTEN* non identificate nel gruppo di confronto delle pazienti a breve sopravvivenza (25). Nella nostra casistica, non sono state riscontrate positività per varianti in *PTEN*. E' da sottolineare che le pazienti positive per *PTEN* descritti in Lheureux et al. mostravano anche la contemporanea positività per *BRCA1/2*, criterio di esclusione nel presente studio. Inoltre, il riscontro di un elevato numero di varianti classificate al momento come VUS ci pone di fronte al dibattito legato alla loro interpretazione di patogenicità. Negli ultimi decenni, la disponibilità di metodologie di sequenziamento del DNA ed analisi dei dati sempre più avanzate, ha incrementato in modo esponenziale il numero delle VUS identificate (46). Negli studi multigenici in campo oncologico, la frequenza di VUS riscontrate è stimata essere del 22% - 33% (47). La diffusione degli approcci di analisi multigenica e di "whole genome sequencing" (29) ha inoltre ampliato le informazioni su geni che prima erano poco indagati e per i quali è ancora necessario valutare l'associazione con i meccanismi patogenetici (16). Inoltre, dalla valutazione delle caratteristiche cliniche si osserva un ampio intervallo di età alla diagnosi che non ci permette di effettuare un'associazione diretta tra la "lunga sopravvivenza" osservata nelle pazienti ed una particolare fascia di età. Per poter trarre conclusioni più esaustive al riguardo, sarà comunque necessario ampliare la casistica delle pazienti arruolate nonché estendere l'analisi anche a gruppi di controllo "a bassa sopravvivenza".

Concludendo, dall'analisi effettuata in questo studio preliminare non si deduce un chiaro coinvolgimento dei geni dell'HRD nel determinare la prolungata sopravvivenza nelle pazienti BRCAness selezionate e non è possibile dedurre una caratterizzazione genetica comune. Tuttavia, nonostante la bassa casistica analizzata, abbiamo riscontrato una positività per alterazioni genetiche riconducibili a questo meccanismo molecolare coerente con la letteratura. Nelle pazienti con cancro ovarico, la frequenza di mutazioni a carico di geni dell'HRD diversi da *BRCA* è generalmente bassa e si attesta al 2-10% (18,19,21). Se si valuta poi il solo sottogruppo delle pazienti a lunga sopravvivenza, la stima del coinvolgimento dell'HRD è variabile ed influenzata soprattutto dalla tipologia di geni analizzati (1,25,35,42). In uno studio condotto su 390 pazienti affetti da cancro ovarico di tipo sieroso, la percentuale di positività per varianti germinali e/o somatiche in geni HRD non-*BRCA* è del 26%. Queste pazienti mostrano un'alta sensibilità al platino e una migliore stima di sopravvivenza (42). Tuttavia, è necessario sottolineare la difficoltà nel formulare un diretto paragone tra questo studio e gli altri già presenti in letteratura. Ciò è da ricollegare alle diverse casistiche dei pazienti arruolati, alla mancanza di consenso sui geni HRD, alla modalità di valutazione dell'HRD da tenere in considerazione, agli anni di monitoraggio valutati e all'analisi genetica di tipo

germinale e/o somatico. Questa sostanziale eterogeneità metodologica e clinica limita la possibilità di trarre conclusioni esaustive sull'argomento. Tenendo in considerazione il basso numero dei pazienti arruolati, questo studio è da considerarsi di tipo esplorativo. Per poter meglio caratterizzare le pazienti in esame dal punto di vista molecolare, sarà importante rivalutare i casi di positività con un'indagine di tipo germinale. Tale valutazione, da effettuare sulle alterazioni geniche riscontrate con una maggiore frequenza allelica, ci permetterà di interpretare i dati ottenuti in un contesto eredo-familiare e di valutare pienamente la potenzialità del test somatico. I risultati di questo primo gruppo di pazienti vanno inoltre inquadrati in un percorso di monitoraggio completo per poterne comprendere la rilevanza clinica. Inoltre, è plausibile l'ipotesi che non tutti i geni dell'HRD incidano allo stesso modo sui meccanismi di sensibilità alla terapia e sulla sopravvivenza. Studi funzionali sono necessari per stabilire il peso di ciascuno di essi nella patogenesi e nell'andamento del carcinoma ovarico. In relazione a ciò, sarà importante poter espandere l'analisi molecolare anche alle pazienti BRCAness a bassa sopravvivenza afferenti al nostro dipartimento. Inoltre, è oggetto di valutazione la possibilità di ampliare lo studio dell'HRD includendo altri geni nel pannello di sequenziamento e indagando il fenomeno con altri approcci metodologici come la valutazione dei meccanismi epigenetici di regolazione. Nell'era del sequenziamento dell'intero genoma, lo studio di casistiche selezionate di pazienti ci darà l'opportunità di valutare anche altri meccanismi biochimici e metabolici. Inoltre, tale approccio sarà sicuramente utile nella stratificazione e nella caratterizzazione delle diverse tipologie di cancro ovarico, ampliando le possibilità diagnostiche. Nel caso dell'HGSOC, l'obiettivo primario è identificare quali alterazioni molecolari determinano la sensibilità al trattamento, così come è stato storicamente per *BRCA*, espandendo l'accesso alla terapia. La necessità di indirizzare gli studi molecolari in una direzione sempre più personalizzata si traduce in una selezione sempre più ristretta della casistica da analizzare. Le rare pazienti BRCAness HGSOC, stabilmente sensibili al platino rappresentano senza dubbio un esempio rilevante in tal senso. Lo studio di questo gruppo ristretto di pazienti darà la possibilità di ampliare le conoscenze sulla biologia del tumore ovarico con l'obiettivo finale di incrementare le possibilità di sopravvivenza.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Yang SYC, Lheureux S, Karakasis K, et al. Landscape of genomic alterations in high-grade serous ovarian cancer from exceptional long- and short-term survivors. *Genome Med* 2018;10:81.
2. Cress RD, Chen YS, Morris CR, et al. Characteristics of

- long-term survivors of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2015;126:491-7.
3. Gadducci A, Guarneri V, Peccatori FA, et al. Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status. *J Ovarian Res* 2019;12:9.
 4. Hoppenot C, Eckert MA, Tienda SM, et al. Who are the long-term survivors of high grade serous ovarian cancer? *Gynecol Oncol* 2018;148:204-12.
 5. Wei W, Li N, Sun Y, et al. Clinical outcome and prognostic factors of patients with early-stage epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8:23862-70.
 6. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, et al. High-Grade Serous Ovarian Cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *Int J Mol Sci* 2019;20:952.
 7. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF, et al. Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4700-10.
 8. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:3686-96.
 9. Akesson M, Jakobsen AM, Zetterqvist BM, et al. A population-based 5-year cohort study including all cases of epithelial ovarian cancer in western Sweden: 10-year survival and prognostic factors. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:116-23.
 10. Lambert HE, Gregory WM, Nelstrop AE, et al. Long-term survival in 463 women treated with platinum analogs for advanced epithelial carcinoma of the ovary: life expectancy compared to women of an age-matched normal population. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:772-8.
 11. Kaern J, Aghmesheh M, Nesland JM, et al. Prognostic factors in ovarian carcinoma stage III patients. Can biomarkers improve the prediction of short- and long-term survivors? *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:1014-22.
 12. Dao F, Schlappe BA, Tseng J, et al. Characteristics of 10-year survivors of high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2016;141:260-3.
 13. Jones MR, Kamara D, Karlan BY, et al. Genetic epidemiology of ovarian cancer and prospects for polygenic risk prediction. *Gynecol Oncol* 2017;147:705-13.
 14. Kohn EC, Ivy SP. Whence High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2017;37:443-8.
 15. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609-15.
 16. Hauke J, Horvath J, Groß E, et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med* 2018;7:1349-58.
 17. Li W, Shao D, Li L, et al. Germline and somatic mutations of multi-gene panel in Chinese patients with epithelial ovarian cancer: a prospective cohort study. *J Ovarian Res* 2019;12:80.
 18. Harter P, Hauke J, Heitz F, et al. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS One* 2017;12:e0186043.
 19. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, et al. Homologous recombination deficiency: exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov* 2015;5:1137-54.
 20. Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, et al. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. *Gynecol Oncol* 2015;137:86-92.
 21. Frey MK, Pothuri B. Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature. *Gynecol Oncol Res Pract* 2017;4:4.
 22. Capoluongo E, La Verde N, Barberis M, et al. BRCA1/2 Molecular assay for ovarian cancer patients: a survey through Italian departments of oncology and molecular and genomic diagnostic laboratories. *Diagnostics* 2019;9:146.
 23. Quinn JE, James CR, Stewart GE, et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:7413-20.
 24. Candido-dos-Reis FJ, Song H, Goode EL, et al. Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:652-7.
 25. Lheureux S, Lai Z, Dougherty BA, et al. Long-Term Responders on Olaparib Maintenance in High-Grade Serous Ovarian Cancer: Clinical and Molecular Characterization. *Clin Cancer Res* 2017;23:4086-94.
 26. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali. *Biochim Clin* 2019;43:90-105.
 27. Garsed DW, Alsop K, Fereday S, et al. Homologous Recombination DNA Repair Pathway Disruption and Retinoblastoma Protein Loss Are Associated with Exceptional Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2018;24:569-80.
 28. Capoluongo E, Scambia G, Nabholz JM. Main implications related to the switch to BRCA1/2 tumor testing in ovarian cancer patients: a proposal of a consensus. *Oncotarget* 2018;9:19463-8.
 29. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. *Biochim Clin* 2019;43:435-8.
 30. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, et al. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* 2011;32:557-63.
 31. Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003; 21:577-81.
 32. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* 2018; 46, D1062-D1067.
 33. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D941-D947.
 34. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536:285-91.
 35. Tumiala M, Hietanen S, Hynninen J, et al. A Functional homologous recombination assay predicts primary chemotherapy response and long-term survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2018;24:4482-93.
 36. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016;375:2154-64.
 37. Ramus SJ, Song H, Dicks E, et al. Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015. doi: 10.1093/jnci/djv214.
 38. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*. 2011;43:879-82.

39. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006;66:8109–15.
40. Liu FW, Tewari KS. New targeted agents in gynecologic cancers: synthetic lethality, homologous recombination deficiency, and PARP Inhibitors. *Curr Treat Options Oncol* 2016;17:12.
41. Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol* 2016;2:482-90.
42. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014;20:764-75.
43. Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J, et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 2018;20:7.
44. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 2004;11:377–94.
45. Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, et al. Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Clin Cancer Res* 2004;10:2473–81.
46. Kraus C, Hoyer J, Vasileiou G, et al. Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *Int J Cancer* 2017;140:95-102.
47. Lumish HS, Steinfeld H, Koval C, et al. Impact of panel gene testing for hereditary breast and ovarian cancer on patients. *J Genet Couns* 2017;26:1116-29.

Il calcolo del kappa index come valida alternativa alla determinazione delle bande oligoclonali nell'iter diagnostico dei pazienti con sclerosi multipla

Ilaria Crespi¹, Paola Caropreso², Lara Calcagno³, Federica Lombardo², Marta Lamonaca¹, Giulia Sedda⁴,
Monica Maccarini³, Giulio Mengozzi², Giovanna Patrucco⁵

¹Struttura Complessa Direzione Universitaria di Biochimica Clinica Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedale Maggiore della Carità, Novara

²Struttura Complessa Laboratorio di Biochimica Clinica Baldi e Riberi Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino

³Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera S.S. Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

⁴Divisione di Chirurgia Toracica IEO Istituto Europeo di Oncologia IRCCS, Milano

⁵Direttivo SIBioC Piemonte, componente Gruppo di Studio Proteine

ABSTRACT

The Kappa Index as a valid alternative to oligoclonal bands determination in the diagnostic process of patients with multiple sclerosis.

Introduction: the role of the kappa free light chains (KFLC) index in the diagnostic workup of multiple sclerosis (MS) is still a matter of debate.

Methods: 667 subjects from three reference laboratories have been enrolled, including 181 MS patients and 486 controls with other immune-mediated or non-inflammatory disorders. Serum and cerebrospinal fluid KFLC index, serum and cerebrospinal fluid albumin and IgG concentrations were measured on BNII nephelometer (Siemens Healthineers, Marburg, Germany), while oligoclonal bands (OCB) were detected by isoelectrofocusing on Hydrasys system (Sebia, Bagno a Ripoli, Italia).

Results: KFLC index was higher in MS than in controls [median (interquartile range - IQR) 76.56 (35.05) *versus* 17.99 (2,34), $p < 0.001$]. A cut-off of 5.0 resulted in 93.9% (min-max 82.6-96.0) sensitivity and 77.4% (70.3-80.3) specificity, with positive and negative predictive values of 60.7% (41.4-69.3) and 97.2% (93.6-98.0), respectively. OCB assessment yielded 94.6% (87.9-96.5) sensitivity and 91.4% (86.6-94.8) specificity, with positive and negative predictive values of 87.5% (78.6-92.0) and 96.4 (93.6-98.0), respectively. The three laboratories showed similar results, making it possible to adopt common thresholds. The relatively low specificity of KFLC may be related to the characteristics of the control population, in particular to the percentage of subjects with inflammatory conditions associated with intrathecal immunoreactivity.

Conclusions: an algorithm for the diagnostic management of MS could be suggested based on the KFLC index as screening test, followed by the detection of OCB, in case of a positive result. Future studies are needed to evaluate possible relationships between KFLC index, as a quantitative variable, and other clinical features of MS, such as severity of the disease and prognostic scores.

INTRODUZIONE

L'analisi del liquido cefalorachidiano (CSF) è un passaggio chiave nella diagnosi di molte malattie neurologiche infiammatorie e non (1) e in particolar modo della Sclerosi Multipla (SM). La SM è una malattia infiammatoria demielinizzante cronica del sistema

nervoso centrale che viene diagnosticata sulla base di criteri clinici, radiologici e biochimici, che videro il loro esordio nel 1983 quando Poser et al (2), introdussero il concetto di "laboratory supported Multiple Sclerosis diagnosis" in seguito al quale le bande oligoclonali (OCB) furono adottate come criterio per porre diagnosi di disseminazione temporale (DIT). L'individuazione di tali

Corrispondenza a: Ilaria Crespi, S.C.D.U. Biochimica Clinica Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedale Maggiore della Carità, Corso Mazzini 18, 28100 Novara, Tel 0321 3733726 - 3472110445, E-mail ilaria.crespi@maggioreosp.novara.it

Ricevuto: 14.06.2020

Revisionato: 20.08.2020

Accettato: 15.09.2020

Pubblicato on-line: 14.01.2021

DOI: 10.19186/BC_2020.087

criteri fu resa possibile in seguito alla pubblicazione del metodo di riferimento per la determinazione delle OCB basato su isoelettrofocalizzazione (IEF) in gel di agarosio, seguita da blotting e immunorilevazione, da parte di Thompson (3). Nel 2001, i primi criteri di McDonald (4), diedero maggiore evidenza all'emergente Risonanza Magnetica (RM). Nei successivi anni (2005-2010) fu data sempre più importanza alla RM, tanto che nel 2010 (5), l'analisi del CSF e, in particolare, la valutazione della sintesi intratecale di immunoglobuline, non fu considerata essenziale per la diagnosi. Una revisione più recente, del 2017, ha dato maggiore rilievo all'analisi biochimica del CSF per la diagnosi di SM, in particolare nei pazienti che presentano un singolo episodio sintomatologico, diversi, quindi, dai pazienti tipici con manifestazioni chiare per la patologia, ovvero, un secondo evento clinico e/o un aumento del numero e della estensione delle lesioni evidenziabili con tecniche di imaging (6). Il gold standard per l'analisi biochimica del CSF volta a ricercare le OCB è l'isoelettrofocalizzazione (IEF) su gel di agarosio, blotting e immunorilevazione delle immunoglobuline G (IgG). Questa tecnica è prevalentemente manuale e richiede personale qualificato esperto sia per l'esecuzione che per la refertazione (7), che rimane, pertanto, prevalentemente soggettiva e comporta, complessivamente, tempi molto lunghi. Storicamente, la sintesi intratecale di IgG veniva rilevata anche tramite un indice IgG (indice di Link), calcolato come rapporto tra il quoziente di IgG (IgG CSF/IgG siero) e il quoziente di albumina (albumina CSF/albumina siero) (8). Di recente, la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline (CLL) in nefelometria/turbidimetria è stata proposta come metodo alternativo alla misura delle IgG e l'indice delle catene leggere libere kappa (CLLK) è stato proposto come alternativo all'indice di Link, le cui prestazioni diagnostiche si sono recentemente dimostrate inferiori (9). È stata, quindi, avanzata la possibilità che questo indice o anche altri parametri e formule di calcolo più complesse (1), possano sostituirsi o affiancarsi al rilevamento delle OCB tramite IEF (10). I meccanismi fisiopatologici alla base di tale ipotesi consistono nel fatto che linfociti B e plasmacellule sintetizzano un'abbondante quantità di CLLK e lambda (CLLL) durante l'assemblaggio delle immunoglobuline (11,12). Pertanto è possibile che, in presenza di aumentata sintesi intratecale di immunoglobuline, si evidenzino un aumento misurabile della concentrazione di CLL; la quantificazione delle CLL, grazie ad una ottima sensibilità delle metodiche automatizzate, dovrebbe permettere di monitorare l'attività delle cellule B all'interno del compartimento cerebrospinale, quali produttrici di anticorpi. Proprio come nel caso dell'indice di Link, l'indice CLLK può essere calcolato come rapporto tra il quoziente di CLLK (CLLK CSF/CLLK siero) e il quoziente di albumina (albumina CSF/albumina siero) (13). Mentre ci sono solide prove per il ruolo diagnostico chiave delle CLLK (14), il ruolo delle CLLL rimane poco chiaro e l'indice CLLL non

risulta, fino ad ora, di chiaro utilizzo clinico.

In questo lavoro basato sull'esperienza di tre differenti laboratori, l'indice CLLK viene proposto quale test di screening altamente sensibile per la diagnosi di SM e per la valutazione della sintesi intratecale di immunoglobuline, in alternativa o come complemento alla ricerca delle OCB. L'approccio metodologico proposto può essere eventualmente seguito dalla ricerca delle OCB mediante IEF, quale test di conferma esclusivamente per valori dell'indice CLLK superiori ad un determinato valore soglia (15). L'algoritmo diagnostico, che ne consegue, risulterebbe comparabile ad una già consolidata prassi nel campo dei test riflessi come, ad esempio, per la diagnostica tiroidea (TSH reflex) (16,17) e prostatica (PSA reflex) (18). Inoltre, questo approccio sequenziale è stato recentemente considerato ragionevole, di facile introduzione nella pratica di laboratorio ed estremamente vantaggioso dal punto di vista economico (15). In particolare, gli obiettivi che questo studio multicentrico si propone sono: la conferma del potenziale ruolo di screening dell'indice CLLK nella gestione diagnostica dei pazienti con SM su un elevato numero di pazienti; la valutazione delle prestazioni analitiche di tre laboratori differenti che eseguono le misure con lo stesso kit diagnostico e la stessa strumentazione analitica su una popolazione numerosa e di tipologia eterogenea.

METODI

Pazienti

Per questo studio osservazionale multicentrico, sono stati arruolati prospetticamente, 699 pazienti da aprile 2014 ad aprile 2019 complessivamente. Prima di ogni procedura, tutti i pazienti hanno firmato il Consenso Informato per la riaccentesi e l'esecuzione degli esami di laboratorio. Lo studio condotto, secondo la Dichiarazione di Helsinki e le buone norme di pratica clinica, dal Laboratorio di Biochimica Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Maggiore della Carità di Novara come capofila, ha coinvolto altri due centri piemontesi: il Laboratorio dell'Azienda Sanitaria Ospedaliera (ASO) SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria e il Laboratorio di Biochimica Clinica Baldi e Riberi dell'Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Città della Salute e della Scienza di Torino.

Procedure di laboratorio

Tutti i centri hanno impiegato le medesime metodiche e procedure preanalitiche e analitiche al fine di ottenere un risultato comparabile. La concentrazione degli analiti nel siero e nel CSF è stata determinata tramite tecnica nefelometrica con sistema BN II (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Germany). Per la determinazione della concentrazione dei diversi analiti sono stati utilizzati i protocolli della ditta Siemens Healthcare Diagnostic. Per l'albumina è stato impiegato N Antiserum to human albumin, con un limite inferiore

Tabella 1*Risultati degli esami biochimici nella popolazione esaminata*

	Età	CSF-CLLK mg/dL	S-CLLK mg/dL	Quoziente CLLK	CSF-Albumina mg/dL	S-Albumina mg/dL	Quoziente Albumina	Indice K
Media	49,38	0,30	3,11	0,19	37,25	4161,2	0,0096	33,89
DS	18,44	0,85	19,22	0,62	134,07	703,2	0,0403	99,38
Mediana	49,00	0,045	1,44	0,026	24,00	4200,0	0,0057	3,34
Minimo	1,00	0,003	0,050	0,001	5,60	703,2	0,0014	0,015
Massimo	91,00	11,30	480,00	13,2	3402,00	6500,0	1,0278	1686,19
Intervallo interquartile	29	0,200	0,88	0,131	18,12	820	0,005	23,49
1°-3° quartile	35-64	0,02-0,22	1,09-1,97	0,012-0,143	17,8-35,9	3780-4600	0,004-0,009	1,78-25,3

CLLK: catene leggere libere kappa; CSF: liquido cerebro-spinale

della curva di calibrazione di 0,17 mg/L; il coefficiente di variazione (CV) medio dei tre laboratori per la misura su siero era 4,3% e 3,6% rispettivamente per il livello basso e medio, mentre era 2,6% per la misura su CSF. Per la misura delle IgG è stato impiegato N Antiserum to human immunoglobulin con limite inferiore della curva di calibrazione di 0,034 mg/L; il CV medio dei tre laboratori per la misura su siero era 3,4% e 2,1% rispettivamente per il livello basso e medio, mentre era 2,2% per la misura su CSF. La concentrazione di CLLK è stata misurata con il kit N latex FLC Kappa con limite inferiore della curva di calibrazione di 0,035 mg/L; il CV medio dei tre laboratori per la misura su siero era 1,9% e 2,2% rispettivamente per i livelli basso e medio, mentre era 3,4% per la misura su CSF. I quozienti di CLLK e di albumina sono stati calcolati come rapporti fra le concentrazioni assolute nel CSF e nel siero. L'indice CLLK è stato calcolato come rapporto fra il quoziente CLLK e il quoziente di albumina. Come valore soglia di riferimento è stato utilizzato 5,0 come riportato dal nostro gruppo (9,15). Sul siero e su CSF di ogni paziente è stata ricercata l'eventuale presenza di OCB mediante IEF e successiva rivelazione immunologica (19) su gel di agarosio con kit Hydragel 1-3 o Hydragel 1-9 CSF Isofocusing e sistema Hydrasys (Sebia, Bagno a Ripoli, Firenze). Il gel è stato valutato indipendentemente da due operatori per la presenza di OCB e per l'attribuzione di uno dei cinque profili proposti nel Consensus Europeo (20). Sono stati considerati positivi per sintesi intratecale di IgG i profili II (presenza di OCB esclusivamente nel CSF) e III (presenza di OCB sia nel CSF che nel siero ma netta prevalenza nel CSF) (20).

Metodi statistici

Per le analisi statistiche è stato usato il programma R © (R Core Team 2019) (21). La significatività statistica è stata considerata per $p < 0,05$ se non altresì specificato e gli intervalli di confidenza pari al 95%.

Nella analisi descrittiva dei risultati sono stati calcolati e riportati media (deviazione standard), mediana e intervallo interquartile (IQR). Il test statistico utilizzato per il confronto tra i due gruppi studiati è stato il test non parametrico di Mann-Whitney.

RISULTATI

Informazioni clinico-demografiche

Sono stati esclusi dallo studio 32 pazienti in quanto mancavano dati essenziali ai fini dell'analisi. Dei pazienti eleggibili (667 pazienti), 97 afferivano al Laboratorio dell'ASO Santissimi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria (14,6%), 169 al Laboratorio Baldi Riberi dell'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (25,3%) e la maggioranza (401 pazienti pari 60,1%) dal Laboratorio di Biochimica Clinica della AOU Maggiore della Carità di Novara. L'età media dei pazienti studiati è risultata essere di 49 anni (intervallo 1-91 anni), equamente distribuiti nei due sessi (53,6% femmine). Di questi pazienti, 181 presentavano diagnosi di SM secondo gli attuali criteri clinici di Mc Donald, in rapporto al quadro clinico, ai dati di imaging (RMN) e ai risultati della IEF volta a dimostrare una sintesi intratecale di IgG (a 142 pazienti è stato attribuito un profilo di tipo II e a 30 un profilo di tipo III); altri 486 pazienti presentavano diagnosi di patologia non infiammatoria o infiammatoria, ma non SM, del sistema nervoso centrale con attribuzione di 265 profili di tipo I e 122 profili di tipo IV. In 11 pazienti sono stati riscontrati profili di tipo V.

Dati di laboratorio

Nella popolazione analizzata, il valore medio di concentrazione (mediana e IQR) delle CLLK nel CSF è di 0,30 (49; 35-64) mg/dL e di 3,1 (1,4; 1,09-1,97) mg/dL nel siero. La concentrazione media di albumina nel CSF è risultata essere 37,3 (24; 17,8-35,9) mg/dL e nel siero 4161 (4200; 3780-4600) mg/dL. Il quoziente di CLLK

Tabella 2

Risultati dei parametri biochimici valutati i nei pazienti con Sclerosi Multipla (SM) e pazienti non-SM.

		Non-Sclerosi Multipla	Sclerosi Multipla	p
Età, anni	Media (DS)	52,89 (19,02)	39,98 (12,7)	0,008
	Mediana	53	40	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	29,5 40-69,5	20,2 30-50,2	
CSF-CLLK mg/dL	Media (DS)	0,19 (0,63)	0,60 (1,239)	< 0,001
	Mediana	0,030	0,235	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	0,065 0,015-0,080	0,471 0,114-0,585	
S-CLLK mg/dL	Media (DS)	3,46 (22,09)	2,18 (7,16)	0,441
	Mediana	2,12	1,95	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	1,98 1,12-3,09	1,76 1,01-2,77	
Quoziente CLLK	Media (DS)	0,123 (0,655)	0,377 (0,495)	< 0,001
	Mediana	0,016	0,176	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	0,028 0,009-0,037	0,340 0,089-0,429	
CSF-Albumina mg/dL	Media (DS)	41,01 (155,73)	27,15 (31,73)	0,018
	Mediana	0,025	0,021	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	0,021 0,018-0,039	0,014 0,017-0,031	
S-Albumina mg/dL	Media (DS)	4054 (726)	4448 (543)	0,015
	Mediana	4100	4400	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	850 3650-4500	762 4097-4859	
Quoziente Albumina	Media (DS)	0,011 (0,047)	0,006 (0,006)	0,158
	Mediana	0,064	0,058	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	0,065 0,004-0,010	0,037 0,004-0,041	
Indice CLLK	Media (DS)	17,99 (88,45)	76,56 (113,82)	<0,001
	Mediana	2,34	35,05	
	Intervallo interquartile (1°-3° quartile)	3,15 1,55-4,70	66,97 15,88-82,85	

CLLK, catene leggere libere kappa; CSF, liquido cerebro-spinale; DS, deviazione standard.

La significatività statistica della differenza fra i due gruppi è stata valutata con il test di Mann-Whitney

(rapporto fra concentrazione nel CSF e quella nel siero) è risultato essere 0,192 (0,26; 0,12-0,143). mentre il quoziente di albumina è risultato essere 0,0096 (0,0057; 0,004-0,009). L'indice di CLLK (rapporto fra quoziente di CLLK e quoziente di albumina, indice K) nella coorte analizzata presentava un livello medio pari a 33,89 (3,34; 1,78-25,3). I dati relativi (comprensivi anche di mediana e valori minimi e massimi) sono riassunti nella Tabella 1. I dati nei due gruppi (SM *versus* non-SM), sono riportati nella Tabella 2. Risulta evidente come la concentrazione di CLLK nel CSF, il quoziente CLLK e l'indice CLLK risultino significativamente superiori nel gruppo SM rispetto al gruppo non-SM, in accordo con quanto ampiamente riportato in letteratura, ma su un numero di pazienti molto elevato. Di particolare rilevanza è l'evidenza di un elevato quoziente CLLK che suggerisce l'origine intratecale delle stesse catene, a fronte di una sovrapposibilità, fra i due gruppi, del

quoziente di albumina. Questa caratteristica è ancora meglio espressa dalla correlazione grafica fra questi due parametri. Come riportato nella Figura 1, in doppia scala logaritmica, i dati riferiti ai pazienti affetti da SM, si posizionano pressoché tutti, indipendentemente dal laboratorio di provenienza, nel quadrante superiore sinistro (elevato quoziente CLLK, basso quoziente albumina), mentre i dati relativi ai pazienti non-SM si distribuiscono, per la grande maggioranza, nella parte inferiore del grafico. È possibile, tuttavia, identificare un certo numero di pazienti non-SM con un quoziente di CLLK particolarmente elevato in rapporto al quoziente di albumina, a suggerire, comunque, una non elevatissima specificità del rapporto quoziente CLLK/quoziente albumina (indice CLLK) nella identificazione dei pazienti affetti da SM.

Sono stati, quindi, calcolati i parametri relativi alle prestazioni diagnostiche dell'indice CLLK utilizzando un

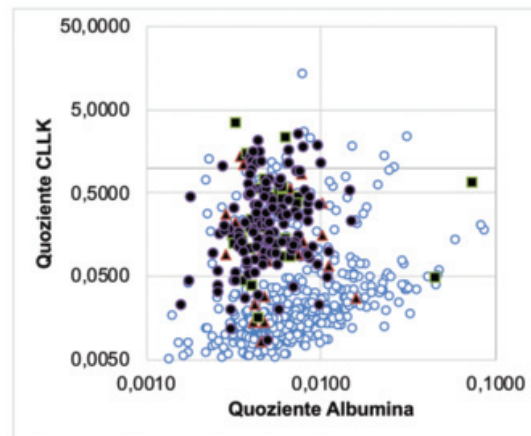


Figura 1

Correlazione fra quoziente catene leggere libere kappa (CLLK) e quoziente albumina nella popolazione studiata. I simboli vuoti rappresentano i pazienti non-SM; i simboli pieni rappresentano i pazienti SM. I pazienti SM sono suddivisi in base alla provenienza: Novara (cerchi pieni), Alessandria (triangoli pieni), Torino (quadrati pieni).

calcolatore bayesiano (<https://www.sipmel.it/risorse/strumenti/calcolatore>) e un valore soglia di 5,0. Per quanto concerne la diagnosi di SM, e come era atteso dalla analisi grafica precedente, l'indice CLLK è risultato avere una sensibilità particolarmente elevata (superiore al 93%) che, in un laboratorio ha raggiunto il 96%, a fronte di una buona specificità (superiore al 77%) come descritto nella Tabella 3, dove sono riportati i valori relativi a tutti i pazienti e i valori minimi e massimi riscontrati nei tre laboratori. La caratteristica di elevata sensibilità e buona specificità è risultata costante anche differenziando i dati per singolo laboratorio (dati non presentati). Tali peculiarità spiegano anche l'elevato potere predittivo negativo del test stesso, superiore al 97% per i dati presi nel loro insieme e, comunque sempre superiore al 93%, quando analizzati per singolo laboratorio. Lo stesso tipo di analisi è stato condotto nei confronti della diagnosi di sintesi intratecale di IgG, valutata come positività all'immunofissazione per bande oligoclonali IgG dopo isofocalizzazione di CSF e siero con tipologie II e III. Anche in questo caso i risultati non solo sono comparabili fra i tre laboratori ma sono analoghi, dal punto di vista qualitativo, a quanto riscontrato per la diagnosi di SM. Infatti, il test ha dimostrato una sensibilità, specificità e potere predittivo negativo sempre superiori al 90% (con sensibilità del 94,5%) e con una forbice fra i tre laboratori veramente ristretta (Tabella 3). È stato quindi valutato come potevano modificarsi le prestazioni diagnostiche del test in rapporto ad una variazione del valore soglia (Tabella 4). Questa analisi è stata condotta per confrontare i risultati ottenuti nel presente studio multicentrico con quelli ottenuti in precedenza da altri studi monocentrici che hanno impiegato la medesima tecnologia (15,22,23). Per quanto concerne la diagnosi di SM, come era facilmente prevedibile, un abbassamento del valore soglia porta ad un lieve miglioramento della

sensibilità (inferiore comunque al 3,5%) e del potere predittivo negativo (vicino comunque al 1%). Al contrario, un innalzamento del valore soglia determina un drastico peggioramento della sensibilità, superiore a 10 punti percentuali. Analoghi risultati, dal punto di vista qualitativo, sono stati ottenuti allorché le prestazioni diagnostiche del test venivano valutate nei confronti della sintesi intratecale di IgG (Tabella 4).

DISCUSSIONE

Numerose sono ormai le evidenze a favore di una risposta immunitaria importante e localizzata a livello intratecale nella SM (24). Fra le tante evidenze a favore di questo processo sta la dimostrazione di un aumento della concentrazione CLL nel CSF dei pazienti affetti da tale patologia. Negli ultimi anni, la misura delle CLL ha attratto l'attenzione per il suo impiego quale indice diagnostico importante nella diagnosi e nella gestione dei pazienti con SM. L'interesse si è particolarmente focalizzato sulle CLLK a fronte della dimostrazione di una reazione immunitaria squilibrata a favore delle catene CLLK nella SM (25,26). Fra i vari parametri proposti, l'indice CLLK è concordemente ritenuto essere l'espressione biochimica clinica di una aumentata concentrazione di CLL delle immunoglobuline in sede intratecale legata ad una sua aumentata produzione in loco e non ad un passaggio dal compartimento vascolare a causa di un aumento delle permeabilità della barriera emato-encefalica. In letteratura i vari studi a supporto della potenzialità diagnostica di questo indice sono in qualche modo indeboliti dalla individuazione di valori soglia di "normalità" differenti anche in caso dell'utilizzo della stessa metodica di misura (15,22,23). I risultati della indagine multicentrica riportata in questo studio confermano come l'indice CLLK, per le sue elevate caratteristiche di sensibilità, specificità e potere

Tabella 3

Prestazioni diagnostiche dell'indice CLLK per la diagnosi di Sclerosi Multipla e di sintesi intratecale di IgG.

	Sclerosi Multipla			Diagnosi di Sintesi intratecale IgG tramite IEF		
	Totali	min	max	Totali	min	max
Sensibilità (%)	93,9	82,6	96,0	94,5	87,8	96,4
Specificità (%)	77,3	70,2	80,2	91,4	86,6	94,8
Likelihood Ratio per risultato positivo	4,1	3,1	4,8	11	7,2	18,3
Likelihood Ratio risultato negativo	0,08	0,05	0,22	0,06	0,04	0,13
Potere predittivo positivo (%)	60,7	41,4	69,3	87,5	78,5	92,0
Potere predittivo negativo (%)	97,1	93,6	97,9	96,3	93,6	97,9

CLLK, catene leggere libere kappa; IEF, Isoelettrofocalizzazione.

Tabella 4

Prestazioni diagnostiche dell'indice CLLK per la diagnosi di Sclerosi Multipla e di sintesi intratecale di IgG in rapporto ai differenti valori soglia riportati in letteratura

	Diagnosi di Sclerosi Multipla			Diagnosi di Sintesi intratecale IgG tramite IEF		
	2,4 (22)	5,0 (15)	12,5 (23)	2,4 (22)	5,0 (15)	12,5 (23)
Valori soglia (riferimento)						
Sensibilità (%)	97,2	93,9	82,3	98,4	94,5	80,3
Specificità (%)	61,7	77,3	85,3	73,9	91,4	97,0
Likelihood Ratio per risultato positivo	2,5	4,1	5,6	3,7	11,027	29,7
Likelihood Ratio risultato negativo	0,045	0,079	0,207	0,021	0,059	0,202
Potere predittivo positivo (%)	48,6	60,7	67,7	70,7	87,5	95,0
Potere predittivo negativo (%)	98,3	97,1	92,8	98,6	96,3	88,5

CLLK, catene leggere libere kappa; IEF, Isoelettrofocalizzazione.

predittivo negativo, possa essere efficacemente applicato nella diagnostica di laboratorio della SM. Inoltre, la sovrapposibilità dei risultati fra i tre centri che utilizzano le stesse dotazioni tecnologiche e gli stessi kit diagnostici appare rappresentare un eccellente punto di partenza per definire valori soglia comuni e quindi sovrapposibilità diagnostiche. Utilizzando un valore soglia di 5,0, il test è risultato essere dotato di una sensibilità estremamente elevata sia nella valutazione globale dei dati come pure dopo frammentazione dei dati in rapporto ai singoli centri partecipanti. L'elevata sensibilità dimostrata ne fa proporre l'utilizzo come test biochimico di screening, come peraltro inizialmente proposto dal nostro gruppo (15) e successivamente validato da altri (27), all'interno di un algoritmo diagnostico che prevede, in successione, l'esecuzione della misura dei parametri relativi all'indice CLLK e, in caso di risultato positivo, la ricerca delle OCB di tipo IgG

nel CSF. Questo algoritmo è stato, infatti, dimostrato avere una notevole efficacia diagnostica e un costo decisamente sostenibile.

Due problemi emergono dall'analisi dei dati presentati in questo studio: la specificità del test, inferiore alla sua sensibilità e il confronto con la ricerca di OCB tramite IEF. Per quanto concerne il primo punto è necessario ricordare che un'importante risposta immunitaria intratecale è presente anche nelle malattie infiammatorie immuno-mediate e non del sistema nervoso centrale. Nella casistica utilizzata per questo studio erano presenti pazienti con malattie infiammatorie non-SM in una percentuale pari al 34% dei pazienti non-SM e di essi il 33% presentava un indice CLLK superiore al valore soglia di 5,0 (dati non mostrati). La situazione non era molto diversa per la positività di questi pazienti (malattie infiammatorie non-SM) alla ricerca delle OCB di tipo IgG nel CSF; infatti, il 28% di essi presentava un

profilo di tipo II o di tipo III all'IEF. Appare, quindi, evidente che le prestazioni diagnostiche dell'indice CLLK in termini di specificità dipendano molto dalla selezione dei pazienti nel gruppo non-SM: più alto il numero (e la percentuale) di pazienti con malattie infiammatorie, inferiore sarà, necessariamente, la specificità. Una possibile soluzione di questa problematica potrebbe essere l'innalzamento del valore soglia, benché in questo caso, la marcata riduzione della sensibilità la renda poco efficace (Tabella 4). Un altro punto importante nel posizionamento dell'indice CLLK nell'iter diagnostico della SM è la sua possibile associazione con l'IEF per la dimostrazione di OCB di tipo IgG oppure nel suo utilizzo alternativo (28-31). È interessante notare come l'indice CLLK sia dotato di una elevatissima sensibilità e, anche, specificità nei confronti della presenza di OCB di tipo IgG. Il posizionamento del valore soglia a 5,0, come emerge da questo studio, permette di ottenere valori di sensibilità e specificità sempre superiori al 91 % (Tabella 4). I differenti valori di specificità e sensibilità trovati nei tre centri sono da imputare alla diversa numerosità dei pazienti dei vari laboratori (possibile limite dello studio). Tuttavia, è verosimile che questi risultati possano fornire un contributo importante alla discussione attualmente in corso sul fatto che l'indice CLLK possa, in futuro, sostituire, anziché affiancare la ricerca delle OCB nella diagnostica della SM. Tale finalità non era tra gli obiettivi di questo studio e solo ulteriori indagini, disegnate *ad hoc*, potranno dirimere la questione.

In conclusione, l'indice CLLK appare un parametro dotato di elevata sensibilità nella diagnosi della SM e di elevata sensibilità e specificità nella individuazione della sintesi intratecale di immunoglobuline. La validità di questa conclusione è suffragata dall'elevato numero di pazienti indagati e dalla caratteristica multicentrica dell'indagine. Sarà una sfida futura caratterizzare la possibile correlazione di tale indice, proprio per il suo aspetto quantitativo, con altre caratteristiche cliniche della malattia, quali la sua gravità ed evolutività.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano esprimere gratitudine alla dott.ssa Cristiana Lonigro per il suo importante contributo iniziale.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101-22.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-31.
- Paluch UH, Keir G, Moyle S, et al. Quantification of bands produced by isoelectric focusing using immunoperoxidase. *J Clin Pathol* 1984;37:1172-6.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
- Thompson A, Banwell B, Barkhoff F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald Criteria. *Lancet Neurol* 2018;17:162-73.
- Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol* 2005;12:527-30.
- Link H. The value of cerebrospinal fluid immunoglobulin analysis in clinical neurology. *Riv Patol Nerv Ment* 1976;97:323-40.
- Crespi I, Vecchio D, Serino R, et al. K Index is a reliable marker of intrathecal synthesis and an alternative to IgG Index in multiple Sclerosis diagnosis work-up. *J Clin Med* 2019;8:446.
- Bayart JL, Muls N, Van Pesch V. Free kappa light chains in neuroinflammatory disorders: Complement rather than substitute? *Acta Neurol Scand* 2018;138:352-8.
- Hacohen Y, Singh R, Forsyth V, et al. CSF albumin and immunoglobulin analyses in childhood neurologic disorders. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2014;1:e10.
- Owen JA, Punt J, Stranford SA, et al. Kuby Immunology: A W.H. Freeman interactive e-book. New York .2013
- Ramsden DB. Multiple sclerosis: Assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem* 2017;54:5-13.
- Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z, et al. Assessment of intrathecal free light chain synthesis: Comparison of different quantitative methods with the detection of oligoclonal free light chains by isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. *PLoS One* 2016;11:e0166556.
- Crespi I, Sulas MG, Mora R, et al. Combined use of kappa free light chain index and isoelectrofocusing of cerebrospinal fluid in diagnosing multiple sclerosis: performances and costs. *Clin Lab* 2017;63:551-9.
- Feldkamp CS, Carey JL. An algorithmic approach to thyroid function testing in a managed care setting. 3 – year experience. *Am J Clin Pathol* 1996;105:11-6.
- Henze M, Brown SJ, Hadlow NC, et al. Rationalizing thyroid function testing: which tsh cutoffs are optimal for testing free T4? *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:4235-41.
- Ferraro S, Caruso S, Panteghini M. Reflex testing of free prostate-specific antigen as effective health care policy. *Arch Pathol Lab Med* 2019;43:1045-45.
- Halbgebauer S, Huss A, Buttman M, et al. Detection of intrathecal immunoglobulin G synthesis by capillary isoelectric focusing immunoassay in oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J of Neurology* 2016;263:954-60.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. (ultimo accesso: luglio 2020)

22. Passerini G, Dalla Costa G, Sangalli F, et al. Free light chains and intrathecal b cells activity in multiple sclerosis: a prospective study and meta-analysis. *Mult Scler Int* 2016;2016:2303857.
23. Pieri M, Zenobi R, Morello M, et al. Multiple Sclerosis: kFLC index values related to gender. *Mult Scler Relat Disord* 2018;26:58-60.
24. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol* 2019;26:27-40.
25. Puthenparampil M, Altinier S, Stropparo E, et al. Intrathecal K free light chain synthesis in multiple sclerosis at clinical onset associates with local IgG production and improves the diagnostic value of cerebrospinal fluid examination. *Mult Scler Relat Disord* 2018;25:241-5.
26. Altinier S, Puthenparampil M, Zaninotto M, et al. Free light chains in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients negative for IgG oligoclonal bands. *Clin Chim Acta* 2019;496:117-20.
27. Bayart JL, Muls N, Van Pesch V. Free Kappa light chains in neuroinflammatory disorders: Complement rather than substitute? *Acta Neurol Scand*. 2018;138:352-8.
28. Arrambide G, Tintore M, Espejo C, et al. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain*. 2018;141:1075-84.
29. Ferraro D, Trovati A, Bedin R, et al. Cerebrospinal fluid kappa and lambda free light chains in oligoclonal band-negative patients with suspected multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2020;27:461-7.
30. Cavalla P, Caropreso P, Limoncelli S, et al. Kappa free light chains index in the differential diagnosis of multiple sclerosis from neuromyelitis optica spectrum disorders and other immune-mediated central nervous system disorders. *J Neuroimmunol* 2020;339:577122.
31. Lo Sasso B, Bivona G, Gambino CM, et al. Catene leggere libere nella diagnostica liquorale della Sclerosi Multipla: possibile alternativa alla ricerca delle bande oligoclonali? *Biochim Clin* 2020;44:157-67.

Approcci diagnostici innovativi per le malattie infiammatorie croniche intestinali

Andrea Padoan¹, Daniela Basso¹, Renata D'Incà², Giorgio Arrigoni³, Maria Luisa Scapellato⁴, Nicole Contran¹, Mario Plebani¹

¹Dipartimento di Medicina (DIMED), Università degli Studi di Padova e Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS), Servizi di Diagnostica Integrata, Azienda Ospedale-Università di Padova;

²Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e Gastroenterologiche (DISCOG), Università degli Studi di Padova

³Dipartimento di Scienze Biomediche (BIOMED), Università degli Studi di Padova

⁴Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità pubblica, Università degli Studi di Padova

Questo lavoro è stato in parte presentato al 51° Congresso Nazionale SIBioC, 20-22 Novembre 2019, Padova, quale Comunicazione Orale

ABSTRACT

New diagnostic approaches for inflammatory bowel diseases.

Inflammatory bowel diseases (IBD), that include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are among the most serious and perplexing digestive diseases. Indeed, diagnosis is sometimes delayed due to the variability and subtlety of its initial manifestations, especially in CD. Since no gold standard is currently defined for the diagnosis and monitoring of IBD, a number of genomic, metabolomic and proteomic studies have tried to address this issue. After illustrating the traditional diagnostic approach (mainly fecal calprotectin), this Opinion Paper reports about the utility of some new biomarkers (micro-RNA, proteomic and metabolomic markers). In particular, the results of a study on fecal peptides are commented. After verifying that proteolytic degradation was clearly visible in fecal samples of a number of control (n=34) and patients with IBD (n=133), the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time of flight (TOF) mass spectrometry was used to evaluate peptides patterns of fecal samples, in a range from 1 000 to 4 000 Da. This cohort was used to derive an algorithm for IBD diagnosis. Diagnostic performances were then estimated using an additional validation cohort, including subjects with IBD (n=42) and without IBD (n= 28). Sensitivity was 54.8% (95%CI: 38.7%–70.2%) and specificity 96.4% (95%CI: 81.7%–99.9%) with a positive and a negative predictive value of 95.8% (95%CI: 76.7%–99.4%) and 58.7% (95%CI: 50.3–66.6%), respectively. In comparison, fecal calprotectin, achieved sensitivity and specificity of 78.6% (95%CI: 63.2%–89.7%) and 42.9% (95%CI: 24.5%–62.8%). In spite of the obtained good diagnostic performances, any candidate biomarker, once identified, should be carefully validated before being translated into clinical practice.

INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie idiopatiche che interessano il tratto gastrointestinale, con una storia clinica caratterizzata da fasi di remissione alternati a periodi di riacutizzazione (1). Secondo la classificazione di Montreal, la malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (RCU) rappresentano le due principali tipologie di MICI, tra le quali si deve includere la colite indeterminata, caratterizzata da

localizzazione colica ma con caratteristiche tali da non permettere una classificazione chiara né alla MC né alla RCU (1,2). L'incidenza di MICI in Italia è variabile da regione a regione ed è più bassa per la MC che per la RCU (3,4). Una analisi ha valutato che tra il 2008 e il 2009 l'incidenza nella regione Lazio era di 12,2 e 14,5 nuovi casi su 100 000 abitanti per MC e RCU, rispettivamente (5). In aggiunta, recenti studi epidemiologici hanno dimostrato che l'incidenza delle MICI presenta una tendenza all' aumento, soprattutto nelle regioni meno industrializzate del pianeta (6).

Corrispondenza a: Andrea Padoan, Dipartimento di Medicina (DIMED), Università degli Studi di Padova e Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale (DIDAS), Servizi di Diagnostica Integrata, Azienda Ospedale-Università di Padova, via Giustiniani 2, 35124 Padova, Tel 049-8212801, E-mail andrea.padoan@unipd.it

Ricevuto: 28.08.2020

Revisionato: 06.11.2020

Accettato: 09.12.2020

Pubblicato on-line: 23.02.2021

DOI: 10.19186/BC_2020.105

Quadro clinico e fattori di rischio

Il quadro clinico delle MICI include dolore addominale persistente, diarrea, anche ematica, e calo ponderale e può essere anche particolarmente severo e invalidante. Pertanto, queste malattie sono generalmente considerate delle malattie "sociali", di grosso impatto economico, caratterizzate da una compromissione a lungo termine della qualità della vita reale, ma che può portare anche a complicanze gravi quali le neoplasie del tratto gastro-intestinale (7,8). L'eziologia di queste affezioni non è ancora chiarita, anche se è considerata multifattoriale e fattori genetici e ambientali ne contribuiscono allo sviluppo. Recentemente sono stati identificati nove fattori di rischio per le MICI, tra cui il fumo, la vita urbana, appendicectomia o tonsillectomia precedenti, l'assunzione di antibiotici, contraccettivi orali e bevande alcoliche, deficit di vitamina D e colonizzazione intestinale da infezioni da *Helicobacter* spp (esclusa la specie *Helicobacter pylori*) (9).

DIAGNOSI

Nelle MICI, e in particolare nella MC, il processo diagnostico può richiedere un periodo lungo di tempo. Infatti, poiché le manifestazioni iniziali possono essere non specifiche e generiche e confuse con sintomatologia legata alla sindrome dell'intestino irritabile, la diagnosi può essere talvolta tardiva (10). La diagnosi di MICI si avvale non solo dei dati clinici, ma anche dei risultati di esami endoscopici, istologici e radiologici. Gli esami di laboratorio di primo livello utilizzati includono l'esame emocromocitometrico, la determinazione della velocità di eritrosedimentazione (VES) e la misura della concentrazione della proteina C reattiva (PCR); tuttavia, questi parametri presentano generalmente un'utilità piuttosto limitata, in quanto sono indicatori di un quadro infiammatorio generico. Altri esami sulle feci quali l'esame parassitologico e la coprocultura, sono eseguiti in concomitanza alle valutazioni biochimiche ed ematologiche, principalmente per escludere casi di diarrea infettiva.

Ad oggi, un marcatore sempre più utilizzato nella diagnosi delle MICI è la calprotectina fecale (CalFec). La calprotectina è un etero-complesso composto dalle proteine S100A8 e S100A9 e la sua conformazione ed attività dipendono dal legame con calcio e zinco (11); è prodotta principalmente dai granulociti neutrofili e può essere rilasciata nel lume intestinale in seguito a processi infiammatori. È stato dimostrato che la calprotectina è resistente alla degradazione proteolitica normalmente presente nel tratto intestinale (12) e pertanto la sua concentrazione può essere determinata efficacemente nelle feci, facilitando quindi il suo utilizzo come marcatore di malattia.

Nel contesto della diagnosi di primo livello, la CalFec permette di differenziare tra sindrome dell'intestino irritabile e le MICI con un valore predittivo negativo (VPN) del 97% e un valore predittivo positivo (VPP) del

40% (13). Valori elevati di CalFec possono indirizzare i pazienti alla visita specialistica e/o ad eventuali ulteriori accertamenti diagnostici. Per la determinazione della CalFec è richiesta una piccola quantità di materiale fecale (almeno 0,5 g) e l'analisi può essere eseguita sia su feci liquide che formate. Ulteriori accertamenti diagnostici possono essere svolti determinando i livelli sierici degli autoanticorpi verso costituenti intestinali endogeni, come gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) e verso i microorganismi, quali gli anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), specialmente per la discriminazione tra MC e RCU. Il tasso di positività ad ANCA (pattern atipico di positività) è del 60-70% nelle RCU e nel 10-30% dei pazienti con MC. Diversamente, gli ASCA sono positivi nel 60%-70% nei pazienti con MC. Inoltre, nei pazienti con ANCA positivi e con MC (10%-15%), il fenotipo clinico è simile a quello della RCU (14). La sola determinazione di ANCA ed ASCA, comunque, non è sufficiente per la diagnosi del sottotipo di malattia, anche se può essere di aiuto per differenziare le due condizioni.

Nuovi marcatori per la diagnosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali e per l'identificazione del sottotipo

Le difficoltà spesso incontrate nella diagnosi, soprattutto nei bambini in cui questa è spesso tardiva, motivano la intensa ricerca di nuovi biomarcatori per le MICI, svolta negli ultimi anni. Altri ambiti di impiego di biomarcatori per le MICI possono essere la caratterizzazione efficace del sottotipo (MC o RCU) e il monitoraggio della ripresa di malattia nel tempo.

È noto che gli RNA non codificanti circolanti, quali i micro-RNA (miRNA), per la loro capacità di indirizzare l'espressione di quasi un terzo di tutti i trascritti umani, hanno un ruolo chiave nello sviluppo e nell'omeostasi dei tessuti. Pertanto, la loro deregolazione è verosimilmente implicata nella patogenesi di diverse malattie umane. Recentemente, i livelli di diversi miRNA sono stati descritti come alterati nelle MICI (15) e, pertanto, è stato suggerito come i miRNA possano avere un ruolo nella diagnosi di malattia, nell'identificazione del sottotipo ed eventualmente anche nel monitoraggio della terapia (16). Per esempio, miR-200c e miR-155, identificati nel siero e verificati essere sovra-espressi nei pazienti con MICI, sono stati descritti come coinvolti nella patogenesi della malattia (16).

Altri ambiti in cui sono stati ricercati e descritti nuovi biomarcatori per le MICI sono la metabolomica clinica e la proteomica clinica. Lo studio del metaboloma è motivato dal concetto che la produzione dei metaboliti (che costituiscono il metaboloma) è regolata ed influenzata, oltre che dagli stati patologici (quali le MICI), anche dai microorganismi intestinali. Pertanto, sia la variazione fisiopatologica causata dalle MICI, sia l'effetto sul microbiota intestinale della malattia stessa possono causare alterazioni significative del metaboloma (17). Tra i diversi metaboliti studiati, è stato evidenziato come i lipidi, la colina e i profili di diversi aminoacidi

differiscano tra MC e RCU. Uno studio recente, ha evidenziato come tra pazienti con MICI e soggetti sani siano rilevabili 173 metaboliti alterati nel siero, inclusi appunto lipidi, amminoacidi e metaboliti del ciclo degli acidi tricarbossilici (16). La scienza che oggi più di altre sembra essere in grado di studiare e catalogare le proteine, quantificandole, è la proteomica. Una recente revisione della letteratura sull'argomento, ha individuato 32 studi di proteomica che analizzano le MICI (18). Considerando complessivamente i risultati, la maggior parte di questi studi ha mostrato che esistono chiare differenze nel proteoma tra pazienti MICI e soggetti di controllo. Tuttavia, sebbene questi nuovi marcatori possano essere utilizzati come esami di primo e di secondo livello per la tipizzazione delle MICI, i risultati non sono ancora stati validati da studi indipendenti, un passaggio fondamentale per l'impiego di nuovi biomarcatori nella pratica clinica.

L'analisi peptidomica delle feci come potenziale strumento per la diagnosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali

La funzione intestinale di assorbimento dei nutrienti è resa possibile dall'attività degli enzimi proteolitici (proteasi), presenti a livello dell'orletto a spazzola (ad esempio enteropeptidasi e aminopeptidasi), a livello intracellulare e di membrana, oppure come enzimi secreti dal pancreas (tripsina, chimotripsina,) (19). Recentemente, è stato suggerito che le proteasi intestinali possano svolgere un ruolo nella patogenesi delle malattie infiammatorie, autoimmuni e neoplastiche gastrointestinali (19). In accordo a quanto riportato in letteratura, una prima analisi preliminare da noi eseguita tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide, su una serie di campioni di feci di 3 soggetti di riferimento e 6 pazienti con MICI, ha permesso di evidenziare che il proteoma fecale è povero nella frazione ad alto peso molecolare (>100 kDa) (Figura 1).

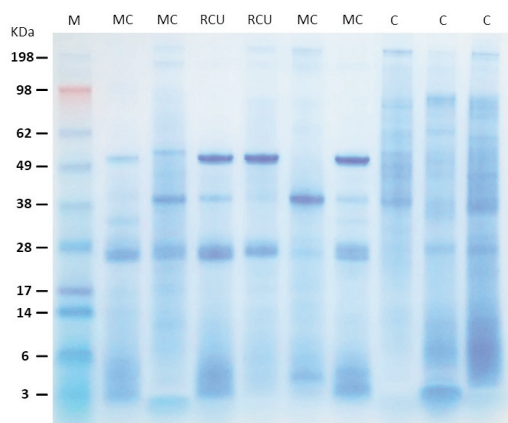


Figura 1. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato di 6 soggetti con MICI e 3 soggetti di riferimento che non presentavano malattie gastrointestinali (M, marcatore di peso molecolare; C, soggetti di controllo; MC, malattia di Chron; RCU, rettocolite ulcerosa).

Inoltre, sono spesso visibili sul gel processi di degradazione proteolitica, presenti sia sui soggetti di controllo che sui soggetti con MICI. Tuttavia, la determinazione delle proteine totali tramite saggio colorimetrico Bradford, ha permesso di evidenziare che le feci hanno un contenuto proteico variabile compreso tra 0,1 e 10 g/L. Nonostante la bassa numerosità dei casi, questi risultati suggeriscono come il materiale fecale non sia quindi privo di proteine/peptidi, sebbene esista una variabilità complessiva, probabilmente legata a fattori quali contenuto in liquidi, la dieta e il metabolismo. Tali risultati esplorativi sono di interesse, sebbene sarebbe opportuno una valutazione del proteoma ad alto peso molecolare su una coorte più diversificata e più ampia di soggetti.

Allo scopo di identificare eventuali differenze nel peptidoma fecale (componente del proteoma che include peptidi con peso molecolare <4000 Da) in relazione alla presenza o assenza delle MICI, è stata utilizzata la tecnologia di spettrometria di massa (MS) a ionizzazione matrice-assistita tramite desorbimento laser (MALDI), accoppiata al metodo di rilevamento basato sul tempo di volo (TOF). L'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF presentava il vantaggio di ottenere dei risultati semi-quantitativi riproducibili in diversi fluidi biologici (20,21), con una fase pre-analitica e analitica rapida e a basso costo. In breve, questo processo analitico (che è stato oggetto di un brevetto Numero 102018000005689 e WO 2019/224663) prevede una fase di estrazione dei peptidi in acqua (estratto). Successivamente, l'estratto viene miscelato in egual volume con la matrice alfa-ciano-4-idrossicinnamico acido (disciolta in 70% acetonitrile e 30% di 0,1% acido trifluoroacetico alla concentrazione di 5mg/mL). Infine, la soluzione viene analizzata tramite spettrometria di massa MALDI-TOF, in un intervallo di massa 1000-4000 Da, come dettagliatamente descritto in una recente pubblicazione (22).

In questo studio sono state arruolate due coorti di individui. La prima coorte (coorte esplorativa), arruolata tra settembre 2016 e settembre 2017, includeva soggetti senza (n=34) (soggetti di controllo) e pazienti con MICI (n=133), di cui 72 MC, 56 RCU e 5 a fenotipo indeterminato. La seconda coorte (coorte di validazione) è stata arruolata tra ottobre 2017 e febbraio 2019 e, similmente alla prima, includeva soggetti di controllo (n=28) e pazienti con MICI (n=42), di cui 27 MC e 15 RCU. Lo studio ha ricevuto l'approvazione dal Comitato Etico Locale (Prot. 3756/AO/16).

L'analisi della coorte esplorativa ha permesso di identificare complessivamente 438 segnali MALDI (picchi); tra questi alcuni erano comuni tra pazienti e soggetti di riferimento, altri erano quasi esclusivamente presenti in uno o nell'altro gruppo. Il risultato più evidente è stato che molti degli spettri di massa dei soggetti di riferimento erano privi di segnali MALDI nell'intervallo di massa studiato in 13/34 (38%) dei casi (Figura 2A) (22). Tra gli spettri di massa dei 21 soggetti rimanenti, è stato identificato un gruppo di picchi di controllo, composto da 12 picchi (2,8%) (gruppo "controllo") presenti

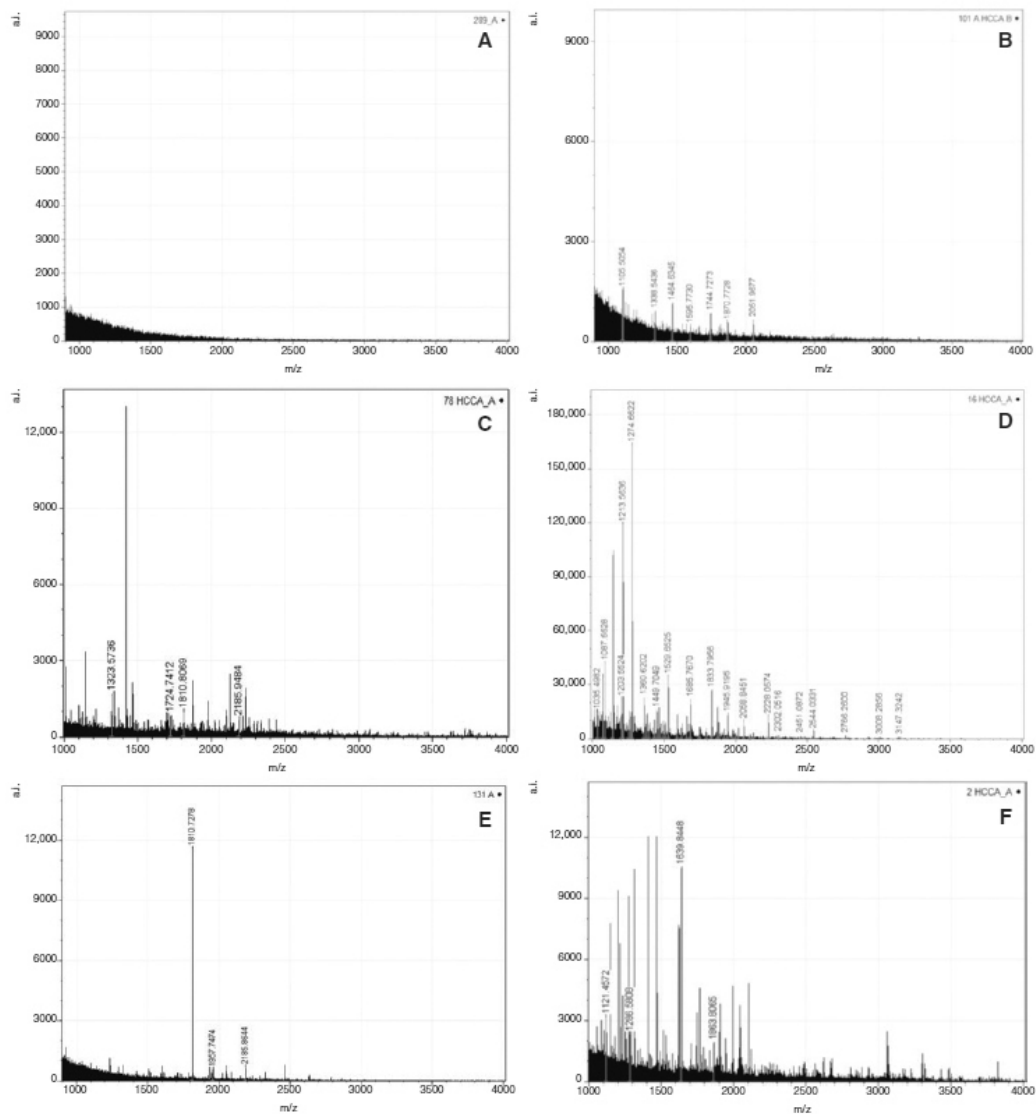


Figura 2. Spettri MALDI-TOF esemplificativi di: pannello A un soggetto di riferimento con spettro privo di picchi; pannello B un soggetto di riferimento con picchi del gruppo “condiviso”; pannelli C e D due spettri di soggetti con malattia di Crohn (MC); pannelli E e F) due spettri di soggetti con rettocolite ulcerosa (RCU).

esclusivamente nei controlli. Inoltre, sono stati identificati 79 picchi condivisi con i pazienti con MICI (gruppo “condivisi”) (22). Considerando gli spettri di massa dei soggetti con MICI, 67/438 (15,3%) picchi erano condivisi tra soggetti di controllo e pazienti (gruppo “condivisi”), mentre 359 (81,9%) picchi erano associati quasi esclusivamente alla malattia (gruppo “MICI”) (22). A questo punto è stato realizzato un algoritmo diagnostico che considerasse i soli segnali MALDI come segue:

- se presenti segnali dei gruppi “controllo” o “condivisi”, allora il campione era da classificare come appartenente a un soggetto di controllo;
- se presenti segnali del gruppo “MICI”, allora il campione era da classificare come appartenente ad un paziente MICI (22).

In base a questo algoritmo, la coorte di validazione è stata classificata in cieco in soggetti di riferimento e MICI e i risultati confrontati con la diagnosi clinica, ottenendo una sensibilità del 54,8% [intervallo di confidenza al 95% (IC95%): 38,7%–70,2%] e una specificità del 96,4% (IC95%: 81,7%–99,9%), con un valore predittivo positivo (VPP) del 95,8% (IC95%: 76,7%–99,4%) e valore predittivo negativo (VPN) del 58,7% (IC95%: 50,3–66,6%). In questa stessa coorte, la CalFec presentava sensibilità del 78,6% (IC95%: 63,2%–89,7%), specificità del 42,9% (IC95%: 24,5%–62,8%), VPP del 67,4% (IC95%: 59,1%–74,7%) e VPN del 57,1% (IC95%: 39,4%–73,3%).

In una ulteriore analisi è stato valutato se attraverso i 359 picchi associati alle MICI era possibile identificare

dei segnali MALDI caratteristici del sottotipo di malattia nella coorte esplorativa. Come risultato, 34 picchi erano associati alla MC, 25 alla RCU. Questi picchi erano associati alla MC ed alla RCU nella corte esplorativa (test esatto di Fisher: $p < 0,0001$ for MC e $p = 0,028$ for RCU).

CONCLUSIONI

L'aumento dell'incidenza delle MICI, unita al fatto che la loro diagnosi può essere tardiva specialmente nei soggetti pediatrici, pone enfasi sull'attuale necessità di identificare nuovi biomarcatori per queste malattie. Diversi approcci, legati prevalentemente alle nuove scienze "omiche", supportano l'utilizzo di nuove tecnologie per la ricerca di biomarcatori su diversi fluidi biologici, tra cui le feci. Tuttavia, prima che questi marcatori possano essere resi disponibili per la diagnostica *in vitro*, devono subire un processo di validazione a più fasi, che garantisca di ottenere risultati robusti e riproducibili. Lo studio qui illustrato rappresenta un esempio di come una tecnologia di spettrometria di massa ad alta produttività, come quella MALDI-TOF, possa essere impiegata efficacemente per fini diagnostici, offrendo al contempo un nuovo ambito di indagine per le MICI, il peptidoma, fin ora poco considerato nella ricerca di nuovi biomarcatori diagnostici. Tuttavia, la strada per trasformare questi risultati in un esame diagnostico alternativo alla CalFec, il marcatore attualmente più utilizzato per la diagnosi delle MICI, richiede ulteriori sforzi, in particolare per l'automazione della fase analitica e per la creazione di un software in grado di interpretare i risultati di spettrometria di massa, nonché la verifica delle caratteristiche operative dell'esame su altri gruppi di soggetti di interesse clinico.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
- Nemati S, Teimourian S. An overview of inflammatory bowel disease: general consideration and genetic screening approach in diagnosis of early onset subsets. *Middle East J Dig Dis* 2017;9:69–80.
- Tragnone A, Corrao G, Miglio F, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Italy: A nationwide population-based study. *Int J Epidemiol* 1996;25:1044–52.
- Galeone C, Pelucchi C, Barbera G, et al. Crohn's disease in Italy: A critical review of the literature using different data sources. *Dig Liver Dis* 2017;49:459–66.
- Di Domenicantonio R, Cappai G, Arcà M, et al. Occurrence of inflammatory bowel disease in central Italy: A study based on health information systems. *Dig Liver Dis* 2014;46:777–82.
- M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: An expanding global health problem. *Clin Med Insights Gastroenterol* 2013;6:33–47.
- Moradkhani A, Beckman LJ, Tabibian JH. Health-related quality of life in inflammatory bowel disease: Psychosocial, clinical, socioeconomic, and demographic predictors. *J Crohn's Colitis* 2013;7:467–73.
- Axelrad JE, Lichtiger S, Yajnik V. Inflammatory bowel disease and cancer: the role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World J Gastroenterol* 2016;22:4794–801.
- Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, et al. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 2019;157:647–59.
- Fiorino G, Danese S. Diagnostic delay in Crohn's Disease: Time for Red Flags *Dig Dis Sci* 2016;61:3097–8.
- Laserna-Mendieta EJ, Lucendo AJ. Faecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: a review focused on meta-analyses and routine usage limitations. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:1295–307.
- Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, et al. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces: A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:793–8.
- Turvill J, O'Connell S, Brooks A, et al. Evaluation of a faecal calprotectin care pathway for use in primary care. *Prim Heal Care Res Dev* 2016;17:428–36.
- Saibeni S, Folli C, de Franchis R, et al. Diagnostic role and clinical correlates of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2003; 35:862–8.
- Coskun M, Bjerrum JT, Seidelin JB, et al. MicroRNAs in inflammatory bowel disease - pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World J Gastroenterol* 2012;18:4629–34.
- Chen P, Zhou G, Lin J, et al. Serum biomarkers for inflammatory bowel disease. *FrontMed* 2020 doi: 10.3389/fmed.2020.00123.
- Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020;17:223–37.
- Gisbert JP, Chaparro M. Clinical usefulness of proteomics in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *J Crohn's Colitis* 2019;13:374–84.
- Antalis TM, Shea-Donohue T, Vogel SN, et al. Mechanisms of disease: Protease functions in intestinal mucosal pathobiology. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:393–402.
- Padoan A, Basso D, La Malfa M, et al. Reproducibility in urine peptidome profiling using MALDI-TOF. *Proteomics* 2015;15:1476–85
- Padoan A, Basso D, Zambon C-F, et al. MALDI-TOF peptidomic analysis of serum and post-prostatic massage urine specimens to identify prostate cancer biomarkers. *Clin Proteom* 2018 doi: 10.1186/s12014-018-9199-8.
- Basso D, Padoan A, D'Incà R, et al. Peptidomic and proteomic analysis of stool for diagnosing IBD and deciphering disease pathogenesis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:968–79.

Introduzione ai Big Data e all'Intelligenza Artificiale in Medicina di Laboratorio

Roberto Guerranti¹, Andrea Padoan², Debora Angeletti³, Marco Foracchia⁴, Tommaso Trenti⁵ per il Gruppo di Studio SIBioC-Associazione Italiana Sistemi Informativi in Sanità (AISIS) "Big Data e Intelligenza Artificiale"

¹Dipartimento Innovazione, Sperimentazione e Ricerca Clinica e Traslazionale, Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese - Dipartimento Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena

²Dipartimento di Medicina (DIMED), Università degli Studi di Padova - Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda-Ospedale Università di Padova

³UOC Sistemi e Tecnologie Informatiche e di Comunicazione, Asl Roma 1, Roma

⁴Servizio Tecnologie Informatiche e Telematiche, Azienda USL di Reggio Emilia, IRCCS

⁵Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria- AUSL di Modena

ABSTRACT

Introduction to Big Data and Artificial Intelligence in Laboratory Medicine

Currently, thanks to the growing computing capacity and the increasing availability of digital data, Data Science is playing an important role in the future development of Laboratory Medicine. However, the concepts of Big Data (BD) and Artificial Intelligence (AI) can still be interpreted in various ways. Clinical laboratories are certainly among the health care organizations producing an important number of data that can be considered BD and it is certainly not a coincidence that they are among the first health organizations to have implemented computer systems within their workflows. Through a process called Data Mining it is possible to extract useful information from BD using automatic or semi-automatic methods that must be preceded by Data Cleaning in order to ensure the cleanliness and correctness of the data themselves. Regarding Data Analysis, several Machine Learning or Deep Learning techniques based on different algorithms or on the functioning principle of neural networks can be used; for the development of these techniques, R and Python programming languages are really useful. Although many applications can be useful in Laboratory Medicine, there are still some obstacles to overcome, including poor harmonization of data or fragmentation of sources; moreover, the issue of data accessibility must be managed considering patient's privacy as a priority. Finally, there is an increase in apprehension related to the awareness of the inevitable innovation in the Laboratory Medicine field in the near future, because of these new approaches. To face these challenges, it is necessary that these topics become familiar to the professionals of Laboratory Medicine. Aim of this Document is to share information about BD and AI in order to contribute to the introduction and development of these methodologies in the field of Laboratory Medicine.

PREMESSA

Considerata la vastità e il crescente interesse per il tema in oggetto, questo documento costituisce un approccio iniziale all'argomento con l'intento di renderlo familiare all'interno della nostra disciplina; conseguentemente, questo primo documento del Gruppo di Studio SIBioC-Associazione Italiana Sistemi Informativi in Sanità (AISIS) "Big Data e Intelligenza Artificiale" non deve considerarsi esaustivo.

Si tratta quindi di un approccio generale sull'argomento che sarà seguito da altri documenti su aspetti più specifici, considerato che lo scopo del GdS è favorire la crescita delle competenze sui Big Data (BD) e sull'Intelligenza Artificiale (IA) per contribuire allo sviluppo di queste metodologie nell'ambito della Medicina di Laboratorio.

Per favorire la familiarizzazione con i concetti illustrati, viene fornito, alla fine del documento, un glossario

Corrispondenza a: Roberto Guerranti, Dipartimento Innovazione, Sperimentazione e Ricerca Clinica e Traslazionale, Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Dipartimento Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena

Ricevuto: 15.07.2020

Revisionato: 06.08.2020

Accettato: 30.08.2020

Publicato on-line: 22.12.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.085

INTRODUZIONE

Il termine BD (letteralmente Grandi Dati) è diventato un neologismo utilizzato in modo ricorrente e diffusamente anche senza comprenderne in profondità il significato; anche fra i professionisti di laboratorio, il concetto di BD può essere interpretato in modi diversi in base al contesto considerato (1). E' un concetto in rapida evoluzione nella tecnologia dell'informazione e nella gestione dei dati, che insieme a quello di IA ha permesso lo sviluppo della disciplina conosciuta come Data Science (DS).

Il termine è sicuramente collegato al volume di informazioni registrate in modalità elettronica che è vertiginosamente aumentato negli ultimi anni. In particolare, i laboratori clinici, diversamente da altre realtà sanitarie, già da diversi anni hanno implementato sistemi informatici per la gestione dell'enorme mole di risultati degli esami di laboratorio e di referti che vengono prodotti quotidianamente. Inoltre, altre informazioni relative ad aspetti più tecnico/analitici vengono quotidianamente prodotte e gestite in laboratorio a fianco dei dati di interesse clinico.

Questo enorme numero di informazioni riferibili all'ambito della Medicina di Laboratorio, deve essere inizialmente immagazzinato in database o Data Warehouse (DWH) garantendone così una veloce ed efficace gestione ed analisi con i Database Management System (DBMS).

Tali informazioni, considerata anche la loro eterogeneità, devono essere preliminarmente soggette ad un processo in grado di estrapolare dati da più sorgenti per integrarli e raccogliarli in un unico repository, denominato "extraction, transformation, loading" (ETL) di cui una fase importante, definita Data Cleaning (DC), è finalizzata a garantire la correttezza dei dati entro una certa soglia di affidabilità, tramite la rimozione di errori e l'armonizzazione del formato dei dati.

Il passaggio chiave è poi rappresentato dall'estrazione di valore aggiunto dalla complessità di questa mole di dati tenendo conto della crescente importanza di una visione sistemica, di una disponibilità di crescenti risorse computazionali e del potenziamento dei concetti di rete ed integrazione. Diventa così fondamentale utilizzare un approccio multisettoriale ed interdisciplinare ed è necessario introdurre il concetto di IA, una disciplina che studia come fornire ad una macchina la capacità di svolgere compiti e azioni tipici dell'intelligenza umana tramite lo sviluppo di algoritmi di apprendimento automatico gestiti con specifici linguaggi di programmazione.

Bisogna infine considerare che, se da un lato assistiamo ad un crescente interesse nel trattare i problemi della Medicina di Laboratorio con l'approccio dei BD e IA, dall'altro vi è la consapevolezza di un inevitabile e prossimo cambiamento nella Medicina di Laboratorio (2), accompagnata dalla percezione di molti professionisti, del rischio che il medico del futuro possa essere sostituito da un'entità informatica.

Per minimizzare questa percezione, contribuire allo sviluppo di queste tecnologie e approcci metodologici, conoscere i termini specifici e soprattutto chiarire cosa si intende per BD e IA, è necessario diffondere e divulgare la conoscenza della materia, ciascuno nella propria disciplina; questo è precisamente lo scopo di questo documento relativo alla Medicina di Laboratorio.

CARATTERISTICHE DEI BIG DATA INERENTI AL LABORATORIO CLINICO

Il termine BD, al di là del suo significato letterale che si riferisce ad una quantità di dati così grande e complessa da rendere inadeguati i tradizionali sistemi di gestione/analisi, include un concetto più vasto che contempla anche la velocità e la modalità con cui i dati vengono prodotti, come di seguito riportato.

Le 5 V che caratterizzano i Big Data

Le caratteristiche dei BD sono declinate in vari modi che si differenziano in base al "numero delle V" (dalla iniziale dei nomi di tali caratteristiche). In questo documento sono elencate le caratteristiche rappresentate da 5 V (3), in quanto molte declinazioni utilizzate in altre classificazioni sono comunque riconducibili a quelle qui di seguito riportate; inoltre una delle V è rappresentata dal "valore" che costituisce un aspetto fondamentale della Medicina di Laboratorio.

Volume

Il volume è la caratteristica che più si identifica letteralmente con il termine BD e certamente i dati generati in laboratorio presentano "volumi" molto elevati che devono prevedere infrastrutture importanti per il loro salvataggio, backup e per la registrazione nel fascicolo sanitario elettronico (FSE) individuale che rappresenta uno dei pilastri della Sanità Digitale.

Varietà

I dati possono essere ottenuti con diversi formati, sia libero che standardizzato. Inoltre possiamo distinguere i dati non strutturati (ad esempio: commenti al referto, informazioni ricavate dalla cartella clinica) dai dati strutturati (generati ad esempio da strumenti diagnostici e dagli utenti). Entrambi possono essere generati con modalità diverse nell'arco del tempo. Ad esempio, i risultati degli esami di laboratorio vengono generati per la maggior parte in periodi brevi di tempo, anche qualche ora del giorno, mentre altri dati possono essere ottenuti in modo non continuativo in archi temporali più lunghi (mese, anno).

Velocità

Specialmente per i dati che vengono generati rapidamente, sono necessarie tecnologie per

l'acquisizione dei dati "ad alta velocità". E' pertanto importante che le tecnologie informatiche consentano di lavorare sui dati in tempo reale. Questo permette di operare su strutture di dati costantemente aggiornate e non su copie di archivi passati, che potrebbero risultare già obsoleti al momento dell'analisi. A tal fine, è auspicabile adottare nuove tecnologie basate su database non relazionali [ad esempio colonnari, database non relazionali (Not Only SQL -NoSQL)].

I dati generati possono avere ridotta transitorietà. Ad esempio, alcune informazioni aggiuntive registrate nei "middleware" degli strumenti analitici vengono registrate per periodi molto limitati di tempo (alcune ore, giorni o al massimo settimane). Ancor più labili possono essere i dati generati da sensori, log dei web server che registrano dati non essenziali, quali le temperature di esercizio degli strumenti o dei frigoriferi. Tutti questi dati transitori andranno persi se non salvati immediatamente appena generati, pertanto deve essere previsto un sistema informatico che generi un log e un database.

Veridicità

La qualità dei dati ottenuti può essere definita come veridicità. Questo punto deve essere considerato attentamente, in quanto solo dati molto affidabili e di qualità garantiscono un successo significativo nell'ottenimento di informazioni utili al processo decisionale clinico.

Valore

Questa caratteristica è forse la più importante in quanto sta ad indicare che solo se i dati apportano valore se ne può estrarne conoscenza.

Le caratteristiche descritte sono rappresentate in Figura 1.

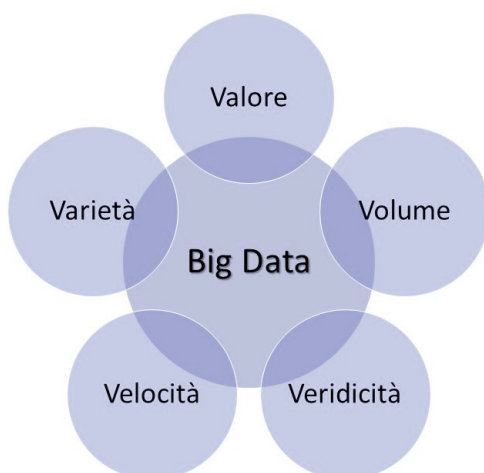


Figura 1
Schema rappresentativo delle 5 V che declinano le caratteristiche principali dei Big Data

Fonti e tipologia dei dati

Il settore della diagnostica in vitro e in particolare il laboratorio di analisi cliniche rappresenta all'interno delle aziende sanitarie uno dei principali produttori di dati con caratteristiche affini a quelle tipicamente associate ai BD. I dati di laboratorio hanno un ruolo di primaria importanza nei progetti di "Salute Digitale" in quanto, rappresentando una grandissima parte dei dati sanitari talora non utilizzati, possono essere analizzati e finalizzati alla conoscenza dello stato di salute della popolazione e alla personalizzazione dei servizi sanitari offerti. Inoltre è importante ricordare che la fonte informativa sulla base della quale sono prese circa il 70% delle decisioni cliniche è quella contenuta nel referto di laboratorio (4).

L'informatizzazione ha giocato un ruolo determinante negli ultimi anni per il laboratorio che, essendo il principale centro nevralgico di controllo dell'appropriatezza clinica e prescrittiva, nonché generatore di profitto, è stato il primo a sviluppare sistemi informatici per la gestione sistematica delle prestazioni erogabili. Il sistema informatico di laboratorio (Laboratory Information System - LIS), registrando in modo continuativo un volume notevole di risultati relativi alle concentrazioni dei vari analiti misurati nelle differenti matrici biologiche e provenienti dalle strumentazioni diagnostiche, rappresenta certamente la principale fonte operativa interna di dati. I BD di laboratorio devono però includere i dati generati in tutte le fasi dell'intero processo di laboratorio che inizia con la richiesta dell'esame e termina con la comunicazione del risultato. Oltre a questi dati che possiamo definire "nobili", vanno così considerati anche i dati generati durante le fasi pre- e post-analitica che non vengono direttamente inseriti nel referto, ma che contengono sicuramente informazioni fondamentali, fra cui ad esempio:

- dati utili per la qualità del risultato rappresentati dai controlli di qualità, tempi e temperature di trasporto dei campioni, gli indici del siero (HIL), dati relativi alla conservazione dei reattivi;
- la comunicazione dei risultati critici;
- i risultati ripetuti, le non conformità, gli audit delle consultazioni e/o le modifiche effettuate rispetto ai dati strumentali.

Per la generazione di questi dati, oltre al LIS vanno quindi considerate altre fonti di dati interne quali i middleware degli strumenti analitici, i programmi dedicati alla gestione e valutazione dei controlli di qualità, i programmi per la gestione del magazzino o i sistemi di qualità informatizzati.

Esistono inoltre fonti dati esterne all'organizzazione da cui provengono; per esempio le anagrafiche dei pazienti o dati non strutturati riferiti al contesto, come i dati ottenuti con il consenso informato del paziente, o relativi ad esempio alla dieta, alle terapie farmacologiche, al quesito diagnostico. Fra le fonti esterne vi è anche un

crescente incremento di dati provenienti da sensori "wearable", cioè i dispositivi indossabili in grado di misurare e registrare parametri fisici (peso, pressione sanguigna e frequenza cardiaca) o clinici (misuratori continui di glicemia).

Purtroppo la sporadica segnalazione del quesito diagnostico, la scarsa diffusione dei sistemi di gestione della qualità o la mancanza di trasferimento nel LIS di alcuni dati dei middleware strumentali, rappresenta un limite all'utilizzo di tali dati, che verrà descritto più avanti nella sezione dedicata.

Relativamente alla tipologia, i dati, possono essere classificati in:

- dati quantitativi, espressi da un valore numerico ed un'unità di misura. Questi dati sono anche detti "hard-data" poiché costituiscono la base delle cosiddette "hard sciences", discipline basate su informazioni rigorose connesse da modelli matematici.
- dati qualitativi definiti anche "soft data". A questa categoria appartengono le etichette ed i descrittori e più in generale quelle informazioni che hanno la caratteristica di essere elaborati dal cervello umano. Un tipico esempio di questo tipo di dati sono i commenti interpretativi, spesso aggiunti al referto.

Questo tipo di classificazione si sovrappone e si interseca con quella che classifica i dati in strutturati e non-strutturati, come già indicato nel paragrafo "Varietà".

ESTRARRE INFORMAZIONI UTILI DAI DATI: ANALISI DEI BIG DATA

Con l'eccezione di alcune situazioni specifiche, un singolo risultato di laboratorio, soprattutto se non accompagnato da evidenze cliniche, può avere un'utilità limitata per il clinico e per il paziente. Affinché un dato/risultato di laboratorio possa fornire informazioni utili al curante, è necessaria una valutazione complessiva che tenga conto degli aspetti significativi della situazione fisiopatologica/patologica in esame.

I due passaggi fondamentali del processo di trasformazione di un dato in conoscenza sono l'analisi, che ne estrapola l'informazione dal valore grezzo, ed il modello, che consente di inquadrare il dato in un contesto semantico interpretativo, ne definisce il significato e stabilisce la correlazione con le altre informazioni, contribuendo in questo modo alla conoscenza medica generale.

Allo scopo di governare l'enorme quantità di dati prodotti, si sono resi necessari strumenti potenti, idonei ed opportuni per ottenere valutazioni puntuali, tempestive, ma anche modulabili con rapidità. Gli avanzamenti delle teorie sui BD e sulla IA prevedono che diversi aspetti e dati relativi al paziente tra loro collegati, possano essere analizzati da sistemi informatici anche al fine di identificare terapie personalizzate per i pazienti. Grazie alla IA è possibile

ottenere valutazioni più potenti ed efficaci dei dati analizzati, che possono meglio essere utilizzate per migliorare lo stato di salute dei cittadini.

Il paradigma della statistica inferenziale, utilizzabile fino a che il numero di dati è contenuto, viene superato nell'era dei BD alla luce di sistemi di apprendimento automatico.

Questi sistemi, infatti, sono caratterizzati da un approccio innovativo dove i modelli statistici canonici più o meno complessi si combinano con strumenti matematici, bioinformatici e/o biologici, utilizzando tecniche computazionali robuste per garantire la riproducibilità e l'attendibilità dei risultati. E proprio in tale paradigma consiste la vera spinta innovativa della IA e del Machine Learning (ML). Un esempio esplicativo è rappresentato dal Deep Learning (DL) nel Natural Language Processing (NLP), in cui spesso il dato è frantumato nelle sue componenti elementari e messo in corrispondenza con altre informazioni attraverso basilari funzioni matematiche, per produrre risultati completi.

Gli strumenti di analisi dei BD presentano quindi un grande valore aggiunto rispetto alle metodologie statistiche classiche, in quanto non solo possono identificare informazioni nascoste o latenti nei dati, altrimenti non identificabili, ma anche spingersi fino all'analisi predittiva e prescrittiva di risultati. Queste analisi, al contrario di quelle di tipo descrittivo che si basano su quanto è accaduto, si proiettano invece nel futuro cercando di anticipare gli eventi e favorendo quindi la medicina preventiva e di precisione. Con questo approccio è inoltre possibile raggiungere una maggiore efficienza dei processi, aumentare la produttività, comprendere le forze e le debolezze di una struttura organizzativa o di un processo, analizzare i rischi del modello utilizzato per poi impiegare nuove strategie per proteggersi dai rischi stessi.

Tra i sistemi di analisi possono essere annoverati tutti gli strumenti di elaborazione sia numerica che grafica adatti ad ottenere misure di sintesi di BD. Oltre a questi sistemi, possono essere utilizzati metodi per l'apprendimento automatico dei dati per ottenere informazioni criptiche o nascoste, non evidenziabili con semplici statistiche descrittive (5).

L'insieme di tecniche e metodologie che hanno per oggetto l'estrazione di informazioni utili da grandi quantità di dati attraverso metodi automatici o semi-automatici è definito Data Mining (DM) (6). Grazie al DM è possibile scoprire all'interno di grandi basi di dati, relazioni, modelli ed informazioni altrimenti non riconoscibili ma potenzialmente utili.

Tutto il processo per estrarre informazione utile dai dati è schematizzato nella Figura 2 e può essere sintetizzato nei seguenti punti:

- definizione del problema;
- raccolta dei dati;
- selezione dei dati;
- elaborazione dei dati tramite un modello;
- produzione di informazione utile.

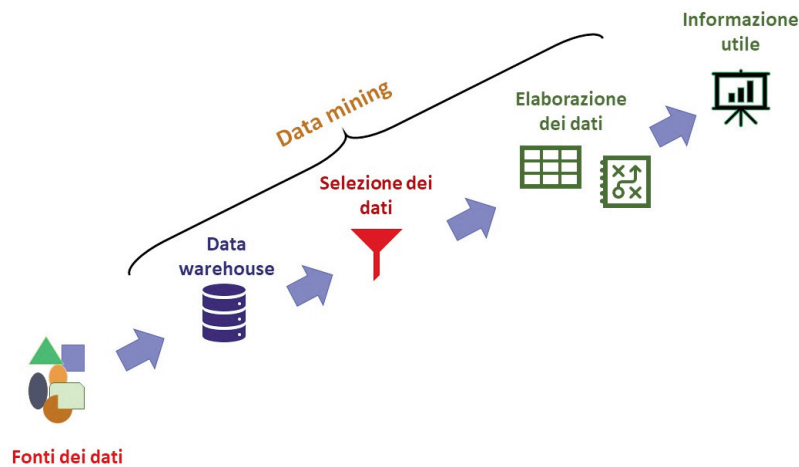


Figura 2

Flusso operativo per la gestione e l'analisi dei Big Data allo scopo di generare informazioni utili (Data Mining)

Una volta definito il problema da affrontare è importante focalizzare l'attenzione sul concetto "raccolta dati" poiché non si tratta di una semplice operazione tecnica ma dipende dal livello di integrazione dei dati di laboratorio con altre fonti di dati ed informazioni disponibili. In questa fase inoltre dovrà essere affrontata anche la problematica dell'accessibilità al dato e la questione della privacy che verrà discussa più avanti. Si comprende quindi come questa fase sia strategica poiché in grado di influenzare il disegno architetturale, il tipo di algoritmo da utilizzare e quindi il risultato finale.

E' inoltre importante garantire la qualità dei dati raccolti nei DWH e a tale scopo, come accennato nell'Introduzione, si utilizza il processo di DC (letteralmente "pulizia dei dati").

Si tratta di una parte fondamentale di tutto il processo e la sua rilevanza è sintetizzata nell'acronimo GIGO (Garbage In - Garbage Out) a significare che qualunque risultato, seppur ottenuto con le migliori tecniche di IA, non avrà valore se ottenuto con dati non confrontabili, sporchi o inesatti. Per pulizia del dato si intende quindi la tipologia di intervento necessaria per permettere che i dati abbiano un livello di qualità necessario ad essere processati successivamente con l'algoritmo più appropriato. Questa fase può richiedere la maggior parte del tempo necessario per tutto il processo di analisi dei dati, poiché si tratta in pratica di dover rimuovere gli outliers, i duplicati, i dati non necessari e correggere le inconsistenze. Per questo motivo all'interno di questa fase, sono richieste anche le competenze di un esperto della disciplina alla quale si riferiscono i dati che si stanno analizzando, nel nostro caso del professionista di laboratorio. Le successive fasi del processo prevedono una corretta selezione dei dati raccolti e, in base agli obiettivi stabiliti, la

scelta della migliore tecnica da utilizzare per analizzare i dati e ricavarne valore.

Intelligenza Artificiale, Machine Learning, Deep Learning

Partendo dalla considerazione che senza grandi quantità di dati non ci può essere l'analisi e l'elaborazione tramite l'IA, la fase successiva all'immagazzinamento dei dati è quella di creare algoritmi e strumenti in grado di eseguire delle operazioni in autonomia, anche in modo simile al cervello umano. L'IA è un termine che, nonostante abbia guadagnato popolarità recentemente, risale addirittura al 1956 quando fu introdotto durante un convegno tenutosi presso il Dartmouth College di Hanover nel New Hampshire. E' un termine molto vasto che può essere usato per ogni tecnica che permette ad un computer di mimare il cervello umano e che comprende il ML e il DL. Il ML, o apprendimento automatico, è una branca dell'IA ed è riferita alla capacità di una macchina di apprendere dall'esperienza attraverso specifici metodi computazionali che le permettono di sviluppare un proprio algoritmo interno ovvero la capacità relativa di una macchina di apprendere senza essere esplicitamente programmata per farlo.

Esistono molti tipi di algoritmi la cui descrizione dettagliata non rientra tra gli scopi di questo documento, ma che possono essere classificati come supervisionati, non-supervisionati o semi-supervisionati. Si parla di algoritmo supervisionato quando l'addestramento viene effettuato con una serie di dati di cui si conosce l'output, mentre si parla di algoritmo non-supervisionato quando l'algoritmo produce autonomamente un modello senza conoscere prioritariamente l'output. L'algoritmo semi-

supervisionato è intermedio fra i due algoritmi menzionati, e si usa quando si conosce l'output solo di una piccola parte dei dati.

La scelta dell'utilizzo dei diversi algoritmi dipende dalla problematica da risolvere: gli algoritmi supervisionati sono utilizzati per applicazioni di classificazione e regressione mentre gli algoritmi non-supervisionati si usano per applicazioni di "clustering" ed identificazione di profili.

In Figura 3 è schematizzata la differenza fra il processo di ML con algoritmo supervisionato e la programmazione classica. Nel ML piuttosto che partire dall'input, scrivere l'algoritmo e ottenere un output, si parte dall'input e dall'output ed utilizzando un algoritmo, si lascia che sia la macchina a comprendere le relazioni tra questi dando infine come risultato un modello che ci servirà a risolvere il problema.

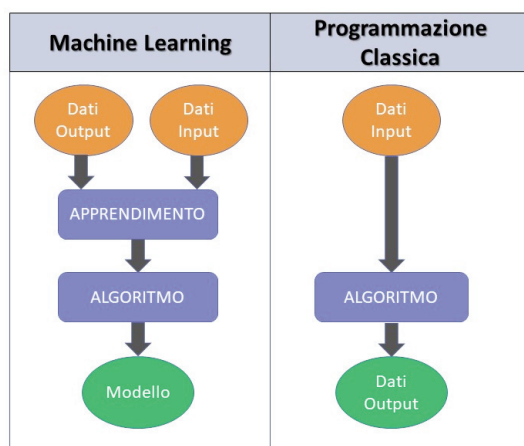


Figura 3
Principali differenze tra programmazione classica e Machine Learning

L'apprendimento automatico è un processo informatico che prevede più fasi: tramite l'utilizzo di una serie di dati, definita "training dataset", si procede con l'addestramento dell'algoritmo che permetterà di ottenere un modello analitico. Successivamente, utilizzando una serie di dati definita "testing dataset", si procede con la validazione del modello. In questa descrizione si possono notare delle similitudini con il processo analitico di laboratorio che si verifica quando, dopo aver messo a punto un nuovo metodo si deve procedere con la sua validazione. E' importante che le due serie di dati siano diverse ma che abbiano comunque un'origine comune, quindi in genere si parte da un'ampia serie omogenea di dati da cui vengono casualmente generate la serie del training (70-80%) e del testing (30-20%). In alternativa possono essere utilizzate tecniche di validazione crociata. Queste consistono nella suddivisione dell'insieme dei dati totali in k parti di numerosità uguale; successivamente (1-k)/k parti dell'insieme dei dati viene utilizzata come l'insieme di addestramento (training dataset); la restante 1/k parte dell'insieme di dati è usata per la validazione (testing dataset). Il processo viene ripetuto k volte per ottenere una stima robusta dei risultati.

La Figura 4 riporta lo schema di addestramento di un algoritmo.

Il DL, o apprendimento approfondito, è un altro approccio all'apprendimento automatico e rappresenta una tecnica avanzata del ML. E' un modello matematico che, ispirandosi al funzionamento dei neuroni del cervello animale, utilizza modelli di reti neurali artificiali multistrato (Artificial Neural Network - ANN) con varie unità di elaborazioni e può sfruttare processi computazionali (7). Questa peculiarità lo rende particolarmente adatto ad essere applicato all'analisi di immagini (riconoscimento delle immagini ematologiche o del sedimento urinario) (8,9), al riconoscimento del linguaggio e all'analisi di parole contenute in documenti.

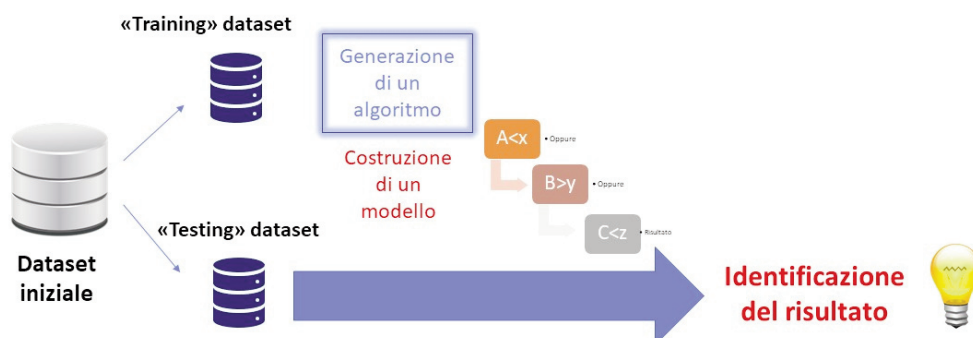


Figura 4
Flusso di lavoro per l'identificazione di algoritmi diagnostici tramite Machine Learning

In sintesi, i 3 termini non devono essere confusi: l'IA è l'obiettivo finale che vogliamo raggiungere, ML è un approccio e il DL è una tecnica del ML. In tutte queste tecniche i dati rivestono un ruolo importantissimo, a volte ancora più importante della tecnologia stessa, perché essi sono la reale fonte di conoscenza che la macchina utilizza per apprendere. Ecco perché il ML e il DL si sono diffusi solo nell'ultimo decennio, in concomitanza alla crescita esponenziale della quantità di dati immagazzinati in formato digitale e alla maggiore potenza di calcolo disponibile. Questi due fattori uniti agli sforzi congiunti delle maggiori compagnie che si occupano di queste tecnologie, stanno facendo avanzare l'IA, come niente mai prima in tutta la storia del genere umano; ciononostante rimangono importanti ostacoli da superare.

LINGUAGGI DI PROGRAMMAZIONE

Gli algoritmi di apprendimento automatico di cui abbiamo precedentemente parlato possono essere implementati utilizzando i moderni linguaggi di programmazione. Nella Scienza dei Dati ci sono fondamentalmente due linguaggi che possono essere utilizzati per analizzare i BD: R e Python. R è un linguaggio molto conosciuto per l'analisi dei dati ed è particolarmente indicato per l'inferenza statistica, cioè la metodologia con cui si rilevano le caratteristiche di una popolazione partendo dall'osservazione di un campione; Python è più indicato per lo studio dell'accuratezza predittiva tipica del ML. Comunque entrambi i linguaggi sono molto flessibili e, grazie alla disponibilità di pacchetti e librerie, possono essere usati indifferentemente in base alla predisposizione dell'utilizzatore. Tra le limitazioni di R è da considerare la scarsa ottimizzazione dell'utilizzo della memoria nei dataset di grosse dimensioni e l'assenza di architettura parallela nativa. A fianco a questi linguaggi disponibili gratuitamente, esistono diverse implementazioni per ML e l'IA di software commerciali, quali SAS (SAS Institute Cary NY), Stata (StataCorp, Lakeway Drive, TX, USA), e SPSS (IBM Corp, Armonk, NY) che garantiscono una importante ottimizzazione delle risorse computazionali e facilità di utilizzo, ma richiedono investimenti non trascurabili per il loro acquisto.

LE BARRIERE PER LO SVILUPPO E L'UTILIZZO DEI BIG DATA

Adeguamento delle procedure sulle questioni etiche e tutela della privacy dei pazienti

Data la necessità di gestire grandi quantità di dati sensibili, particolare attenzione deve essere dedicata alla sicurezza e alla protezione dei dati dei pazienti poiché è intuitivo che con il crescere dei volumi dei dati aumentano anche i rischi connessi alla violazione

della privacy dei pazienti. E se da una parte una scarsa tutela della privacy solleva preoccupazioni legittime, dall'altra, una tutela della privacy troppo spinta in quest'area, può rappresentare un ostacolo all'innovazione basata sui dati (10). Le future architetture di dati dovrebbero presumere che i dati sensibili non possano essere spostati, ma piuttosto che i codici dei modelli debbano essere adattati ai dati. Diverse questioni etiche e normative attualmente ricadono in aree grigie in termini di regolamentazione (modellazione computazionale, Decision Support System) (11).

Per tutelare il rispetto della privacy durante la cura del paziente, tutti gli studi clinici devono essere approvati dai comitati etici nella garanzia del rispetto della Dichiarazione Universale dei diritti umani. I ricercatori possono utilizzare l'informazione sanitaria protetta dei pazienti se ricevono le autorizzazioni dai soggetti tramite il consenso informato; per gli studi sui BD, vi sono almeno due aspetti che rendono questo requisito un ostacolo:

- le diverse modalità e velocità necessarie a gestire una quantità enorme di dati rispetto alle tempistiche necessarie a raccogliere i consensi informati;
- l'utilizzo di dati retrospettivi che rende spesso difficile se non impossibile ricontattare il paziente.

E' comunque possibile che la revoca di tale autorizzazione possa essere concessa dal comitato etico della istituzione coinvolta a particolari condizioni fra cui l'anonimizzazione dei dati da utilizzare (12).

D'altra parte, se la procedura di anonimizzazione dei dati è un modo per andare incontro all'esigenza di garanzia della privacy, d'altro canto i dati senza identificazione diventano a loro volta molto più difficili da collegare, vanificando uno dei principi dei BD ovvero l'integrazione stessa dei dati (11).

Nonostante vi siano molte procedure in questo campo, queste spesso si riferiscono ad un utilizzo tradizionale dei dati e conseguentemente esiste la necessità di adeguarle alle tecniche per i BD. Questo aspetto dovrebbe essere approfondito iniziando con la produzione di raccomandazioni da parte delle Società scientifiche, utilizzando magari anche tecniche di ML che possano valutare il rischio relativo alla violazione della procedura stessa di anonimizzazione.

Frammentazione dei dati

I dati di laboratorio vengono attualmente forniti da più operatori (tecnici laboratorio o infermieri per i POCT), da più laboratori o addirittura dai pazienti stessi quando usano dispositivi per il self-testing o dispositivi indossabili per acquisire misurazioni fisiologiche.

Inoltre si utilizzano supporti diversi, basti pensare alla moltitudine di sistemi informatici utilizzati dalle varie aziende sia pubbliche che private. Di fatto, al momento vi è una scarsa visione strategica/architetturale orientata ai BD e gli stessi acquisti di sistemi diagnostici e di Information and

Communications Technology (ICT) sono spesso progressivi e senza una visione di "gestione integrata del dato" fin dall'inizio. Tutto ciò porta alla frammentazione dei dati che risultano difficilmente integrabili con la necessità di investimenti a posteriori per adeguare il tutto.

L'integrazione "orizzontale" di dati provenienti da diversi servizi medici, con i dati acquisiti dai pazienti stessi, ad esempio utilizzando dispositivi diagnostici personali, offrirebbe una visione longitudinale dei risultati di laboratorio che potrebbe colmare le lacune esistenti. Questo consentirebbe di seguire più da vicino la progressione della malattia ed eventualmente evitare l'inutile ripetizione degli esami.

Scarsa armonizzazione della fonte dei dati

Anche quando i dati sono stati associati a strutture comuni, non è detto che i record possano essere uniti e analizzati insieme. Nel laboratorio, solo un insieme limitato di analiti è sufficientemente standardizzato per garantirne la comparabilità.

Il riutilizzo dei risultati di laboratorio richiede quindi ulteriori voci di dati (materiale, analita, valore, unità di misura e intervallo di riferimento) al fine di supportarne l'interpretazione e la comparabilità (ad esempio il metodo impiegato, il fornitore dei reattivi, lo strumento analitico e i numeri di lotto dei reagenti e dei materiali di consumo).

Anche per l'identificazione univoca della prestazione su una particolare matrice biologica diventa essenziale l'adozione di codifiche uniche nazionali od internazionali quali il LOINC (Logical Observation Identifier Names and Codes) o più in generale lo SNOMED (Systematic Nomenclature of Medicine, Clinical Term) (13).

Se inoltre ci riferiamo ai dati di laboratorio provenienti dalle registrazioni previste dai Sistemi Qualità (problematiche pre- e post-analitiche, non conformità, indicatori, mappatura processi, audit), considerando anche che tale sistema non è ancora così diffuso, il problema della standardizzazione e dell'eterogeneità dei dati è ancora più spiccato (a questo proposito, IFCC è peraltro particolarmente impegnata sulla standardizzazione degli indicatori di qualità) (14).

AMBITI E CONTESTI DI UTILIZZO DEI BIG DATA IN MEDICINA DI LABORATORIO

La trasformazione digitale in sanità, attraverso la creazione di una ricca base di dati sanitari e l'integrazione di tecnologie come l'Internet of Things (IoT), analisi avanzate, ML e IA, è riconosciuta come una componente chiave per affrontare le sfide del futuro (15). In questo contesto, è naturale convenire che un ruolo fondamentale possa essere garantito dalla Medicina di Laboratorio. Ne rappresenta un esempio il numero fiorente di applicazioni della Scienza dei Dati alla Medicina di Laboratorio, le cui

applicazioni spaziano in diversi ambiti (16). Tuttavia, essendo questo documento una trattazione generale sui BD in Medicina di Laboratorio, si riportano di seguito solo alcune applicazioni a titolo indicativo.

Da un lato vi è una loro naturale applicazione nelle scienze "omiche" o nella genetica (ad esempio nel Next Generation Sequencing-NGS) che già necessitano di complesse applicazioni bioinformatiche soprattutto quando queste abbiano una ricaduta per lo sviluppo della medicina personalizzata. Questa enorme quantità di dati è generata per ogni singola analisi e pertanto rappresenta una fonte di informazioni necessarie per l'analisi stessa, ma inutile per configurare un processo di DM. D'altra parte, invece, l'elevato numero di risultati disponibili per un numero rilevante di soggetti può fornire un supporto importante alla medicina di precisione o per identificare algoritmi per la medicina personalizzata.

Un altro ambito di applicazione è riferito agli strumenti di automonitoraggio che, garantendo la possibilità a molti pazienti, in particolare ai diabetici, di effettuare i controlli da casa in vari momenti del giorno, garantiscono l'acquisizione di una grande quantità di dati omogenei.

Il concetto di valori di riferimento è sempre stato un tema fondamentale per la Medicina di Laboratorio ma con dei limiti già nella standardizzazione della definizione di individuo sano o nel numero di soggetti da prendere in considerazione. Tali limitazioni sono destinate ad essere superate con l'approccio dei BD ed i ricercatori possono condividere grandi quantità di dati sugli intervalli di riferimento anche prevedendo stratificazioni nella popolazione (17).

Il raggiungimento di un'elevata qualità delle immagini digitali ha permesso anche lo sviluppo dell'analisi morfologica digitale in ambito ematologico e urinario rispettivamente per l'analisi degli strisci di sangue periferico e per il sedimento urinario, con molte strumentazioni già in commercio che usano questa tecnologia. L'analisi prevede un elevato livello di automazione e permette di classificare con un elevato livello di accuratezza, i diversi elementi (8,9,18).

Vi è inoltre un altro campo di applicazione che non riguarda direttamente i dati dei pazienti ma più l'aspetto gestionale, ovvero l'analisi dei flussi informatici dei dati, delle richieste e della loro appropriatezza; tutto ciò può essere effettuato anche in tempo reale al fine di ottenere un efficace sistema di monitoraggio e controllo dei processi e dei percorsi di cura.

Infine possiamo citare l'aspetto relativo alla gestione da remoto delle tecnologie diagnostiche, sia tramite un'assistenza proattiva basata su dati provenienti da sensori o dati strumentali, piuttosto che il supporto da remoto che permette all'operatore di richiedere assistenza tramite "chatbot", applicazioni in grado di comprendere un input, tanto voce quanto testo, per poi processarlo e provvedere a una risposta

durante la conversazione. In questo ultimo caso tale supporto può essere guidato da un sistema conversazionale intelligente sviluppato grazie alle tecniche nel campo del NLP.

CONCLUSIONI

Come è stato recentemente pubblicato, la Medicina di Laboratorio è una scienza clinica e una disciplina che si prefigge di fornire ai clinici “risultati di misure quantitative o qualitative” affinché possano essere “trasformati in azioni per migliorare la cura e mantenere il benessere dei singoli individui e della popolazione” (19). Ciascun singolo laboratorio medico produce nelle sue attività quotidiane una quantità enorme di informazioni (per esempio tramite il LIS) con caratteristiche tali da rientrare nell’ambito dei BD. Questo fatto non rappresenta per sé una novità, però nuova è la consapevolezza che questa enorme quantità di informazioni possa essere integrata con diverse altre fonti di dati, e successivamente elaborata attraverso sistemi di IA. L’obiettivo di tali sistemi è quello di creare degli strumenti per supportare i clinici nella gestione del paziente dalla diagnosi alla scelta del miglior trattamento (20-21). Come evidenziato dalla situazione pandemica attuale, sia nella sua fase acuta che nell’attuale fase di controllo, monitoraggio e prevenzione, i risultati clinico-diagnostici prodotti dal laboratorio collegati in tempo reale ai dati che arrivano dagli applicativi di gestione sanitaria e dalle APP distribuite ai cittadini, hanno rappresentato e rappresentano uno strumento non solo estremamente potente ma essenziale per le finalità della tutela della salute pubblica e della conoscenza e studio sulla diffusione e geografia dell’infezione da SARS-CoV-2 (22).

La responsabilità della decisione clinica, condivisa con il paziente, rimane comunque del professionista, sia nel caso che decida di avvalersi dei sistemi di IA, sia che decida di non avvalersene, anche se in generale è probabile che si possa sviluppare un meccanismo psicologico di de-responsabilizzazione e di delega dell’intelligenza alle macchine.

Nonostante gli enormi sviluppi delle tecniche di IA in Medicina di Laboratorio, permangono ancora alcuni ostacoli da rimuovere sia per quanto riguarda la qualità dei dati sorgente, che riguardo alle tecnologie/algoritmi da adottare e sulle possibili applicazioni su cui investire. In questo senso il ruolo del professionista di laboratorio è cruciale ed è a lui che spetta il compito di verificare e validare i vari modelli in sviluppo, così come viene fatto per qualunque esame diagnostico di nuova introduzione.

Infine, è necessario non solo che i professionisti di laboratorio conoscano la materia per gestirla al meglio ma anche che si sviluppino competenze adeguate. Sicuramente ci sarà bisogno di creare una figura che alle competenze tradizionali del professionista di laboratorio abbinare le conoscenze computazionali

matematiche. Al momento, in assenza di questa figura nei nostri laboratori, è necessario lavorare all’interno di un gruppo multidisciplinare che comprenda medici, biologi, tecnici di laboratorio ed informatici. Se riusciremo a sfruttare appieno le evidenti potenzialità dei BD si potranno registrare delle trasformazioni radicali con nuove opportunità nella diagnostica di laboratorio (16) e nella medicina in generale.

Come già accaduto per altre aree del mondo ICT, in situazioni analoghe passate, è probabile che serva tempo per elaborare e dominare le nuove tendenze: di sicuro in questa fase c’è ampio spazio per ricerca, studi e tentativi che potranno portare alla creazione di nuovi modelli. L’alternativa è perdere la partita o comunque arrivare a conoscere la vastità del fenomeno troppo tardi o, nella peggiore delle ipotesi, perdere il controllo sulla gestione dell’informazione di Laboratorio.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tolan NV, Parnas ML, Baudhuin LM, et al. Big Data in Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2015;61:1433-40.
2. Neumaier M, Watson ID. The end of Laboratory Medicine as we know it? *Clin Chem Lab Med* 2019;57:305-7.
3. Gupta S, Kar AK, Baabdullah A, et al. Big Data with cognitive computing: A review for the future. *Int J of Inform Manag* 2018;42:78-89.
4. Plebani M. Clinical laboratories: production industry or medical services? *Clin Chem Lab Med* 2015;53:995-1004.
5. Mehta N, Pandit A, Shukla S. Transforming healthcare with Big Data analytics and artificial intelligence: a systematic mapping study. *J Biomed Inform* 2019;100:1-14.
6. Yoo I, Alafaireet P, Marinov M, et al. Data mining in healthcare and biomedicine: a survey of the literature. *J Med Syst* 2012;36:2431-48.
7. LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep Learning. *Nature* 2015;521:436-44.
8. Giavarina D, Carta M. La tele-ematologia nel consolidamento dei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2019;43:125-34.
9. Buoro S, Da Rin G. Esame emocromocitometrico: telemedicina e competenze. *Biochim Clin* 2019;43:348-50.
10. Price WN, Cohen IG. Privacy in the age of Medical Big Data. *Nat Med* 2019;25:37-43.
11. Roca J, Tenyi A, Cano I. Paradigm changes for diagnosis: using big data for prediction. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:317-27.
12. Kayaalp M. Patient privacy in the era of Big Data. *Balkan Med J* 2018;35:8-17.
13. USA National Library of Medicine. Supporting interoperability—terminology, subsets and other resources from NLM. https://www.nlm.nih.gov/hit_interoperability.html. (ultimo accesso: luglio 2020).
14. Sciacovelli L, Lippi G, Sumarac Z, et al. Quality indicators in laboratory medicine: the status of the progress of IFCC

- Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety" project. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:348-57.
15. Gopal G, Suter-Crazzolaro C, Toldo L, et al. Digital transformation in healthcare – architectures of present and future information technologies. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:328-35.
 16. Gruson D, Helleputte T, Rousseau P, et al. Data science, artificial intelligence, and machine learning: Opportunities for laboratory medicine and the value of positive regulation. *Clin Biochem* 2019;69:1-7.
 17. Manral AK, Patel CJ, Ioannidis JPA. In the era of precision medicine and Big Data, who is normal? *JAMA* 2018;319:1981-2.
 18. Jha KK, Dutta HS. Mutual information-based hybrid model and deep learning for acute lymphocytic leukemia detection in single cell blood smear images. *Comput Meth Prog Bio* 2019;179:3-12.
 19. Lippi G, Plebani M. A modern and pragmatic definition of Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1171.
 20. Shortliffe EH, Sepúlveda MJ. Clinical decision support in the era of Artificial Intelligence. *JAMA* 2018;320:2199–200.
 21. Verghese A, Shah N, Harrington RA. What this computer needs is a physician. Humanism and artificial intelligence. *JAMA* 2018;319:19-20.
 22. Adly AS, Adly AS, Adly MS. Approaches based on Artificial Intelligence and the Internet of Intelligent Things to prevent the spread of COVID-19: Scoping Review. *J Med Internet Res* 2020;22:e19104.

GLOSSARIO

Artificial Neural Network (ANN)	Modello computazionale costituito da una rete di nodi ispirato alla struttura e al funzionamento dei neuroni del cervello animale
Algoritmo non-supervisionato	Algoritmo addestrato con una serie di dati di cui non si conosce l'output
Algoritmo semi-supervisionato	Algoritmo addestrato con una serie di dati di cui si conosce l'output solo di una parte di essi
Algoritmo supervisionato	Algoritmo addestrato con una serie di dati di cui si conosce l'output
Big Data (BD)	Insieme di dati, generalmente digitali, di grandi dimensioni che richiedono di essere analizzati con metodi computazionali attraverso metodi e tecnologie specifiche
Data Cleaning (DC)	Processo capace di garantire, con una certa soglia di affidabilità, la pulizia e la correttezza di una grande quantità di dati
Data Mining (DM)	Insieme di tecniche e metodologie che hanno per oggetto l'estrazione di informazioni utili da grandi quantità di dati attraverso metodi automatici o semi-automatici
Data Warehouse (DWH)	Insieme delle strutture dei dati e degli strumenti necessari per ottenere, a partire dai dati operazionali, informazioni che supportano il processo decisionale
Database Management System (DBMS)	Sistema per la gestione dei dati
Deep Learning (DL)	Modelli di apprendimento applicati alle reti neurali artificiali
Extraction, Transformation, Loading (ETL)	Processo in grado di estrapolare dati da più sorgenti per integrarli e raccogliarli in un unico repository
Hard Data	Dati quantitativi espressi da un valore numerico ed una unità di misura
Hard Science	Discipline basate su informazioni rigorose connesse da modelli matematici
Information and Communications Technology (ICT)	Insieme delle tecnologie dell'informazione e della comunicazione
Intelligenza Artificiale (IA)	Disciplina che studia come fornire ad una macchina la capacità di svolgere compiti e azioni tipici dell'intelligenza umana
Machine Learning (ML)	Branca dell'intelligenza artificiale riferita alla capacità di una macchina di apprendere dall'esperienza attraverso specifici metodi computazionali che le permettono di sviluppare un proprio algoritmo interno
Natural Language Processing (NLP)	Processo di trattamento automatico delle informazioni scritte o parlate in una lingua naturale
Not Only SQL (NoSQL)	Termine utilizzato per indicare un database in cui la gestione dei dati non si basa sul sistema relazionale
Scienza dei Dati	Disciplina che si occupa di estrarre valore dai dati utilizzando tecniche di intelligenza artificiale
Soft Data	Dati qualitativi, come i commenti interpretativi
Testing Dataset	Serie di dati utilizzati per fornire una valutazione imparziale di un modello ottenuto da un algoritmo
Training Dataset	Serie di dati utilizzati per addestrare una macchina

Biomarcatori cardiaci: dove stiamo andando?

Aldo Clerico¹, Martina Zaninotto², Andrea Padoan², Silvia Masotti¹ per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-European Ligand Assay Society, Italia “Biomarcatori Cardiaci”

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

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale, Università di Padova, e Dipartimento di Medicina – Università di Padova

ABSTRACT

Cardiac biomarkers: where are we going?

The measurement of cardiac troponins (cTn) is recommended by all guidelines as the gold standard for the detection of differential myocardial injury and acute myocardial infarction (AMI). In this article, some key issues regarding both analytical characteristics of the high-sensitivity methods for cTn, which are still considered controversial or unresolved are discussed in details. These issues have been included in the activities of the Joint Working Group on “Cardiac Biomarkers” of the Italian Society of Clinical Biochemistry and the Italian branch of the European Ligand Assay Society. The major clinical concern regarding hs-cTn methods is the difficulty to differentiate the pathophysiological mechanism responsible for biomarker release from cardiomyocytes after reversible or irreversible injury, respectively. High-sensitivity cTnI and cTnT methods (hs-cTn) enable to monitor myocardial renewal and remodelling, and to promptly identify patients at highest risk of heart failure. In addition, several studies demonstrated that the cardiovascular risk progressively increases in the general population even for hs-cTn values well below the 99th percentile, i.e. the recognized cut-off for the detection of myocardial injury and diagnosis of AMI. An early and effective treatment of individuals at higher cardiovascular risk may revert the initial myocardial remodelling and slow down heart failure progression. Finally, recent studies support the working hypothesis that a new generation of hs-cTn methods should be set up based on monoclonal antibodies, specific for circulating peptide forms more characteristics for reversible rather than irreversible myocardial injury. Of course, screening programs of cardiovascular risk stratification and prevention strategies using hs-cTn methods require further investigation to define the optimal target populations, timing of measurement, and preventive interventions.

INTRODUZIONE

I coordinatori del Gruppo di Studio Inter-Societario dei Biomarcatori Cardiaci delle società Scientifiche di Medicina di Laboratorio Italiane, SIBioC ed European Ligand Assay Society-Italia (ELAS), hanno pensato di utilizzare il fermo forzato del lavoro di ricerca in comune, dovuto al perdurare della pandemia, per fare il punto della situazione sulla attività svolta in questi ultimi anni e gettare le basi per un rilancio sia delle attività sperimentali che di formazione, non appena le condizioni diverranno più favorevoli.

Le più recenti linee guida internazionali (1,2) raccomandano esplicitamente che le Società Scientifiche non solo debbano fare da collegamento tra

il Laboratorio e la Clinica per favorire un più appropriato utilizzo e una migliore interpretazione dei metodi ad alta sensibilità per la determinazione delle troponine cardiache (hs-cTn), ma anche promuovere studi *ad hoc* per migliorare e diffondere le conoscenze scientifiche sulle prestazioni analitiche, le applicazioni fisiopatologiche e l'efficienza ed efficacia cliniche di questi metodi. In accordo con queste raccomandazioni (1,2), il Gruppo di Studio dei Biomarcatori Cardiaci delle Società SIBioC ed ELAS-Italia, in collaborazione con la Associazione Nazionale dei Medici Cardiologi Ospedalieri (ANMCO), ha promosso fin dall'anno 2017 un serie di studi allo scopo di valutare accuratamente e confrontare tra loro, sia le prestazioni analitiche che i risultati clinici, dei nuovi metodi hs-cTnI e hs-cTnT, che in

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 4, 56126 Pisa, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 16.09.2020

Revisionato: 16.09.2020

Accettato: 22.09.2020

Pubblicato on-line: 22.12.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.088

questi ultimi anni sono stati messi a disposizione dei laboratori clinici Italiani.

Le evidenze di questa intensa collaborazione e tra le citate Società Scientifiche Italiane sono costituite dai numerosi articoli che sono stati pubblicati anche su riviste internazionali negli anni 2017-2020 (3-23). In particolare, è poi importate ricordare il numero monografico di *Biochimica Clinica*, pubblicato nel giugno 2020 (Special Supplement 1, 2020, vol. 44), interamente dedicato ai risultati di alcuni di questi studi, e che riporta anche alcuni documenti ufficiali promossi dal Gruppo di Studio Inter-Societario sulle caratteristiche analitiche e l'utilizzo clinico dei metodi hs-cTn (24-28).

ATTIVITA' SCIENTIFICA

Studio multicentrico sui metodi ad alta sensibilità

La maggior parte dei lavori sperimentali portati a termine e poi pubblicati dal Gruppo di Studio in questi ultimi anni, riporta i risultati ottenuti dallo studio multicentrico promosso dalle società scientifiche italiane riguardante il confronto tra i nuovi metodi ad alta sensibilità delle hs-cTn (5,8-18,20). Per questo studio multicentrico, cui hanno partecipato 12 Istituti Clinici e di Ricerca Italiani, sono stati raccolti campioni di sangue eparinato da circa 1600 soggetti normali (età 18-86 anni, rapporto femmine/maschi 0,95) e da circa 1500 pazienti ammessi al pronto soccorso con sospetto di sindrome coronarica acuta (SCA, rispettivamente (17).

Nel corso di questo studio, sono state dapprima valutate le prestazioni analitiche di alcuni metodi hs-cTnI e hs-cTnT, resi disponibili per i laboratori clinici in Italia dalle aziende produttrici. Per ciascuno di questi metodi hs-cTnI o hs-cTnT, sono stati calcolati il valore di LoB (limit of blank), di sensibilità analitica (espressa come LoD, limit of detection), e del limite di quantificazione (LoQ), sia al 10% che al 20 % CV, in accordo con le procedure raccomandate dai protocolli internazionali (5,8-18). Per questi studi sono stati utilizzati non solo campioni di soggetti normali e pazienti con malattie cardiache, ma anche campioni di controllo di qualità che sono stati impiegati in cicli di VEQ ed attualmente utilizzati in molti laboratori Italiani (14,16-18). E' stata infine calcolata la distribuzione dei valori di cTnI misurati con i tre metodi ad alta sensibilità Architect, Access and ADVIA in una popolazione di riferimento, che includeva più di 1400 soggetti in apparente buona salute. Per il calcolo dei parametri statistici della popolazione di riferimento è stata anche utilizzata la tecnica di ri-campionamento con re-immissione dei dati (metodo bootstrap), che permette una stima più affidabile del valore del 99° percentile e dei suoi limiti di confidenza rispetto al metodo meno complesso raccomandato dalle linee guida (metodo non parametrico) (17).

Documenti inter-societari

Nello stesso tempo, sempre grazie alla collaborazione tra le società di Medicina di Laboratorio (SIBioC ed ELAS), di Cardiologia (ANMCO) e dei Medici di Famiglia, sono stati pubblicati alcuni documenti che riguardano l'utilizzo dei biomarcatori cardiaci nei pazienti con malattie cardiache (sindrome coronarica acuta e scompenso cardiaco), nei pazienti oncologici in trattamento con farmaci chemioterapici potenzialmente cardi tossici ed anche nella popolazione generale per la valutazione del rischio cardiovascolare, sia su *Biochimica Clinica* (6,7,24,25,27,28) che su riviste internazionali (3,23). Questi documenti presentano e discutono le evidenze sperimentali che dimostrano che livelli aumentati di hs-cTn sia in soggetti asintomatici che in pazienti con malattie cardiache, sono sempre associati a prognosi peggiore. Il valore prognostico dei valori di cTn, misurati con metodi ad alta sensibilità, risulta indipendente ed additivo rispetto agli altri fattori classici di rischio, compresi i peptidi natriuretici cardiaci (soprattutto BNP e NT-proBNP) (21,28). Molte evidenze supportano il loro utilizzo in sotto-gruppi di soggetti che potrebbero essere a rischio di presentare in breve tempo un rimodellamento cardiaco progressivo (3,6,7,21,23-25, 27-31). Per quanto riguarda i pazienti con neoplasie, recenti evidenze sperimentali indicano che l'utilizzo di metodi ad alta sensibilità per la misura di cTnI e cTnT consente di evidenziare precocemente un danno miocardico dovuto all'uso terapeutico di farmaci potenzialmente cardi tossici (come la maggior parte dei farmaci antitumorali) (22,23). In questo modo, il biomarcatore cardio-specifico può permettere di identificare i pazienti ad alto rischio di sviluppare a breve termine una insufficienza cardiaca sintomatica e quindi di iniziare precocemente una terapia cardioprotettiva per scongiurare la progressione verso l'insufficienza cardiaca sintomatica (22,23,32).

Fondamenti analitici dei metodi hs-cTn

In questi ultimi anni, il Gruppo di Studio si è dedicato anche a studi teorici sui fondamenti analitici dei metodi immunometrici, come le difficoltà metodologiche riscontrate nello sviluppo di metodi ad alta sensibilità analitica o la necessità di favorire l'armonizzazione tra i risultati ottenuti con metodi differenti che misurano lo stesso biomarcatore, come i metodi hs-cTnI (7,10,17,20). Infatti, coloro che si sono impegnati a mettere a punto metodi immunometrici hs-cTn hanno dovuto affrontare delle sfide veramente molto impegnative dal punto di vista metodologico. Le cTn circolano nel sangue con concentrazioni che possono variare su ben 5 ordini di grandezza, cioè da circa 1 a più di 100 000 ng/L (4,6,7,10,17,19,20). Questo intervallo molto ampio è necessario per poter misurare sia i livelli circolanti nella maggior parte degli individui sani, specialmente

donne, che presentano valori mediamente ≤ 3 ng/L, come pure gli elevati valori del biomarcatore che si riscontrano nei pazienti con estese necrosi miocardiche. Inoltre, le linee guida richiedono che il valore soglia per la diagnosi del danno cardiaco (*myocardial injury*) e dell'infarto del miocardio, cioè il valore del 99° percentile della distribuzione del biomarcatore nella popolazione di riferimento sana (99° percentile URL), sia misurato con un errore $\leq 10\%$ (espresso come coefficiente di variazione, CV) (1,34). È importante sottolineare il notevole progresso metodologico conseguito in questi ultimi anni in questo campo; infatti, i metodi hs-cTnI e hs-cTnT, attualmente disponibili sul mercato italiano, sono in grado di misurare il 99° percentile URL con un CV di circa il 5%, cioè praticamente la metà del valore richiesto dalle linee guida (2,6,8,10,13,14,17-19). Tuttavia, nonostante questo importante miglioramento nelle prestazioni analitiche, i metodi hs-cTn non sono ancora in grado di misurare i livelli circolanti in più del 95% dei soggetti adulti sani, specialmente se si considerano separatamente le giovani donne (18-45 anni) (2,6,8,10,13,14,17-19).

Inoltre, questi metodi possono ancora presentare interferenze, soprattutto dovute alla presenza di auto-anticorpi, anticorpi eterofili o macro-complessi circolanti, costituiti da anticorpi leganti la troponina (10,19,35-41). Anche l'assunzione di integratori o preparati farmaceutici contenenti alte dosi di biotina possono causare interferenza in alcuni metodi per la misura delle cTnI e cTnT, che utilizzano il sistema streptavidina-biotina per la separazione dell'antigene libero/legato utilizzato nel sistema immunometrico (10,19,42,43). È importante ricordare che queste interferenze dovute a biotina ed anticorpi circolanti possono causare sia un aumento che una diminuzione del valore reale misurato con il metodo hs-cTn. Questa sotto o sovra-stima della misura è in relazione sia al sistema immunometrico utilizzato per la separazione antigene libero/legato e per la rilevazione del segnale, che alla affinità verso il biomarcatore degli anticorpi leganti la troponina presenti nel campione di plasma da analizzare (10,19,41-43). Va comunque sottolineato che le aziende produttrici hanno in questi ultimi anni modificato i metodi immunometrici in modo da ridurre la possibilità di interferenza, dovute sia alla presenza nel campione di biotina che di anticorpi leganti le troponine cardiache.

Differenze sistematiche e necessità di armonizzazione tra i metodi hs-cTnI

Un altro aspetto metodologico, che assume una importante rilevanza clinica, è la differenza dei valori misurati del biomarcatore tra i metodi immunometrici, non solo rispetto ai vari metodi hs-cTnI in confronto del solo metodo cTnT disponibile in commercio, ma anche tra i differenti metodi immunometrici disponibili

per la misura della cTnI (4-7,10, 11,17,19,20,24). Lo studio multicentrico inter-societario SIBioC/ELAS ha confermato che persistono tuttora differenze sistematiche significative tra i valori di hs-cTnI (mediamente una differenza tra metodi del 29,2%) (17).

Queste differenze tra i metodi possono essere dovute sia alle diverse caratteristiche biochimiche e fisiopatologiche delle due troponine I e T (24,44,45), come anche alle differenti prestazioni analitiche dei metodi di misura della cTnI (4-7,10,11,17,19,20, 24,46-50). Infatti, vi sono differenze significative tra le fasi leganti dei tre metodi hs-cTnI valutati nello studio (metodo Architect, metodo Access Dxl, metodo ADVIA Centaur XPT), che risultano fondamentali nel determinare le differenze sistematiche riscontrate tra i valori di hs-cTnI misurati. In particolare, il metodo ADVIA si avvale di tre anticorpi monoclonali, di cui due per la fase legante di cattura ed uno per la rilevazione del segnale. I due anticorpi di cattura riconoscono due differenti epitopi situati rispettivamente sulle estremità opposte N- e C-terminali della cTnI umana. Il terzo anticorpo di rivelazione è invece specifico per la parte più centrale, meno degradabile, della porzione N-terminale della cTnI umana. Per contro, gli altri due metodi testati nello studio, Architect e Access, utilizzano due anticorpi entrambi specifici per la porzione N-terminale, meno degradabile della proteina, situati tra le posizioni 24 e 49 della catena peptidica, di cui, rispettivamente, uno è utilizzato per la fase di cattura e l'altro per la rilevazione del segnale.

Considerando la differente struttura dei tre metodi hs-cTnI, è quindi ipotizzabile che il metodo ADVIA XPT sia più specifico, rispetto ai metodi Architect ed Access, per la forma intatta (meno degradata) della cTnI umana. Infatti, i risultati ottenuti nello studio hanno dimostrato che nei pazienti con SCA vi era una migliore armonizzazione tra i risultati ottenuti dai tre metodi hs-cTnI con coefficienti di correlazione R che variavano da 0,97 a 0,98 rispetto ai coefficienti di correlazione molto meno elevati riscontrati nei soggetti volontari apparentemente sani (valori R da 0,67 a 0,82) (17). Inoltre, l'analisi statistica, che utilizza le componenti principali della varianza (analisi PCA), è stata in grado di spiegare il 98,5% della variabilità totale dei valori del biomarcatore misurati con i tre metodi hs-cTnI nei pazienti con SCA rispetto al 69,0% nei soggetti volontari apparentemente sani (17). La discrepanza tra i risultati ottenuti dal metodo ADVIA XPT rispetto agli altri due metodi potrebbe essere spiegata dal fatto che nei pazienti con SCA la forma intatta (o comunque meno degradata) della cTnI è quella predominante ed è misurata da tutti i tre metodi hs-cTnI. Per contro, nei soggetti sani sono predominanti le forme degradate della cTnI, che sono probabilmente meglio determinate dai metodi Architect e Access rispetto al metodo ADVIA XPT. È importante sottolineare anche che la differenza tra i valori misurati con il metodo ADVIA XPT e i metodi

Architect e Access aumenta con la concentrazione di cTnI nei soggetti apparentemente sani e nei pazienti con danno cardiaco o infarto acuto del miocardio (IMA) (17). Questo risultato suggerisce che tanto più elevata è la concentrazione misurata del biomarcatore in pazienti con danno miocardico o IMA, tanto più elevata risulta anche la probabilità di trovare in circolo forme intatte della proteina. Infatti, più ampia sarà l'area di necrosi miocardica, tanto più elevata sarà anche la quantità di molecole di cTnI intatta (meno degradata) immesse in circolo.

Più recentemente, il Gruppo di Studio si è impegnato a studiare la possibilità di armonizzare i risultati dei metodi hs-cTnI (20). In particolare, è stata valutata l'ipotesi preliminare che i risultati ottenuti con i due metodi hs-cTnI, che forniscono risultati più correlati tra loro (cioè i metodi hs-cTnI Architect e Access) possano essere effettivamente armonizzati utilizzando un semplice approccio matematico-statistico di ri-calibrazione. A questo scopo è stato utilizzato un approccio sperimentale in due fasi. Nella prima fase sono stati utilizzati i dati di 16 campioni di controlli di qualità distribuiti in cicli annuali di VEQ per valutare preliminarmente se la procedura di armonizzazione mediante ri-calibrazione è utilizzabile e fornisce risultati clinicamente accettabili. Nella seconda fase, questa procedura è stata validata utilizzando 2530 campioni di plasma di pazienti ammessi al pronto soccorso con sospetto di SCA. Una significativa riduzione della differenza sistematica tra metodi è stata ottenuta mediante la ri-calibrazione con una riduzione della variazione media (valutata come CV %) dal 38,4% (DS 25,9) al 15,0 (DS 10,6) per valori di hs-cTnI <500 ng/L (20). Questi dati dimostrano che è effettivamente possibile armonizzare tra loro i risultati ottenuti da metodi immunometrici che utilizzano sistemi di cattura e rivelazione con simili specificità anticorpali, come appunto i metodi hs-cTnI Architect e Access (20).

Prospettive future

Come accade continuamente nella ricerca scientifica di qualità, i risultati ottenuti aprono sempre nuove strade e nuove opportunità per ulteriori e più approfonditi studi sperimentali. Ci sono dunque nuove domande a cui si deve rispondere e nuovi aspetti metodologici e clinici che devono essere ancora meglio approfonditi sia sull'interpretazione dei risultati che sull'utilizzo clinico dei metodi hs-cTn.

E' evidente che un errore nella misura o una cattiva interpretazione del risultato ottenuto con i metodi hs-cTn, qualunque ne sia la causa, comporta sempre un possibile danno per il paziente e un aggravio di costi per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN). In particolare, il soggetto/paziente in cui sono stati misurati valori falsi-positivi per danno cardiaco, potrebbe essere sottoposto non solo ad ulteriori analisi di laboratorio, ma anche ad esami strumentali ed interventi anche invasivi, che presentano non

infrequentemente effetti collaterali, e che richiedono il ricovero in centri specializzati, con ricadute molto onerose ed impegnative per il paziente (oltre che per il SSN) (34,51-54). D'altra parte il riscontro di un valore falso-negativo, in un paziente che di fatto presenta un danno miocardico, può comportare una diagnosi clinica inaccurata e quindi un ritardo nell'inizio di una terapia appropriata con conseguente peggioramento della disfunzione cardiaca e progressione verso lo scompenso cardiaco sintomatico (3,25,27,29,51-54).

Da un punto di vista sia fisiopatologico che clinico, risulta quindi indispensabile approfondire meglio i meccanismi che causano il rilascio di troponina dai cardiomiociti, sia nei soggetti normali (a riposo come anche dopo sforzo fisico intenso), che nei pazienti con cardiomiopatia. E' stato suggerito che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti adulti sani siano strettamente collegati al rinnovamento fisiologico dei cardiomiociti (55-60) che dipende, a sua volta, dal processo di maturazione e proliferazione delle cellule staminali endogene. Tali cellule sostituiscono i cardiomiociti, che hanno ormai terminato il ciclo naturale della loro vita e che muoiono per apoptosi (55-60). Una *noxa* patologica può produrre un danno miocardico che può essere reversibile o irreversibile (necrosi cardiaca) (56,57). Tuttavia, l'ipotesi che i livelli circolanti di cTnI e cTnT nei soggetti sani dipendano dal rinnovamento fisiologico non è in grado di spiegare il progressivo incremento dei livelli del biomarcatore in entrambi i sessi dopo i 65 anni di età (1,4,10,17,19,21,28,29,58). Pertanto, è necessario ipotizzare che alcuni meccanismi fisiopatologici siano responsabili di un aumento della morte dei cardiomiociti nel periodo della senescenza (55-60). I risultati di recenti studi hanno dimostrato che alcuni soggetti apparentemente sani con età superiore a 65 anni mostrano effettivamente valori significativamente più elevati della media di hs-cTn, probabilmente causati da un aumento del tasso di mortalità dei cardiomiociti (19,21,28-31). Un numero crescente di evidenze sperimentali sembra avvalorare l'ipotesi che le concentrazioni di hs-cTn in soggetti adulti non ancora sintomatici, con valori in prossimità (ma non al di sopra) del 99° percentile URL, potrebbero indicare la presenza di un danno miocardico asintomatico (19,21,28-31). In particolare, è stato recentemente dimostrato che valori di hs-cTnI, misurati in prelievi seriali nella popolazione generale, che aumentano progressivamente nel tempo, risultano significativi predittori di mortalità e di eventi cardiovascolari acuti (IMA e ictus) (61-62). Benché le linee guida internazionali non raccomandino ancora l'utilizzo dei metodi hs-cTn per lo screening nella popolazione generale (63), molte evidenze suggeriscono l'efficacia della misura dei livelli del biomarcatore, almeno in sotto-gruppi di soggetti che potrebbero essere a rischio di presentare rimodellamento cardiaco progressivo (ipertensione essenziale, obesità, diabete mellito, insufficienza renale, malattia cronica bronco-

polmonare) (19,21,28-31). Un aumento progressivo anche di pochi ng/L (≥ 5 ng/L) dei valori di hs-cTn nel medio periodo (6-12 mesi) potrebbe suggerire la presenza di un rimodellamento patologico e quindi una rapida progressione verso una insufficienza cardiaca sintomatica (19,21,28-31,61-63). Come suggerito anche da altri Autori (31), è necessario promuovere da parte delle Società Scientifiche nuovi studi clinici per identificare nella popolazione generale, con i metodi hs-cTn, gli individui a più elevato rischio cardiovascolare. Sarà ovviamente necessario valutare il costo/beneficio di questi possibili programmi di screening nella popolazione generale, come anche la più efficace metodologia da utilizzare relativamente a tempo, frequenza di campionamento, ed individuazione di eventuali popolazioni bersaglio, che richiedono interventi più frequenti e mirati (31).

Dal punto di vista analitico, sembra necessario lo sviluppo di nuove metodiche immunometriche che siano in grado di distinguere i peptidi, che si originano dalla degradazione a livello citoplasmatico e/o nel circolo periferico del biomarcatore dalla catena intatta della troponina (cioè la proteina presente e fisiologicamente attiva nel sarcomero), che invece sembra essere l'analita predominante nelle prime ore dopo un danno cardiaco irreversibile (come IMA di Tipo 1 o 2) (34,51,55-58). Queste nuove metodiche potrebbero fornire importanti informazioni sui meccanismi fisiologici o patologici di rilascio delle cTn dal miocardiocita nel soggetto sano (sia a riposo che dopo sforzo intenso), come anche nel paziente con un danno miocardico acuto o cronico (55-58). Metodiche cromatografiche potrebbero essere utilizzate insieme a quelle immunometriche per migliorare la specificità della misura (64,65). Questi nuovi metodi potrebbero più accuratamente distinguere tra i pazienti con un danno cardiaco irreversibile, piuttosto che reversibile (55-58).

ATTIVITÀ DIDATTICA E DI FORMAZIONE

Alla luce delle considerazioni precedenti e sulla base dei risultati finora ottenuti grazie all'attività multicentrica oltre che multidisciplinare del Gruppo di Studio Inter-Societario dei Biomarcatori Cardiaca, si possono proporre ed iniziare a programmare alcune attività non solo didattiche e di formazione ma anche di attività sperimentale.

In particolare, data l'importanza degli studi di popolazione e dei dati preliminari che dimostrano come la misura delle troponine cardiache con metodi ad alta sensibilità possa consentire di identificare sottogruppi di soggetti a maggior rischio di progressione del normale rimodellamento cardiaco verso situazioni clinicamente critiche, si proporrà un'attività di formazione (FAD) condivisa anche con le società scientifiche dei cardiologi e dei medici di medicina generale per affrontare dal punto di vista teorico-pratico e di costi-beneficio questa nuova

applicazione delle troponine cardiache, la valutazione del rischio cardiovascolare nella popolazione generale in associazione ai più noti e consolidati fattori di rischio cardiovascolare.

Inoltre, gli sviluppi analitici e di nuovi metodi che riconoscono sia la molecola intatta che diversi frammenti delle troponine cardiache, sono di stimolo per affrontare una ulteriore e più approfondita caratterizzazione delle molecole circolanti con tecnologie analitiche diverse dai tradizionali metodi immunometrici che potrebbero aumentare la specificità dell'informazione clinica fornita dal biomarcatore in relazione alle diverse patologie cardiache o alle tempistiche di progressione o di insorgenza delle stesse. Il modello di studio multidisciplinare e multicentrico adottato finora dal GdS è la strategia che può consentire di migliorare le conoscenze e di produrre evidenze scientificamente rilevanti a vantaggio dei pazienti oltre che dei professionisti della medicina in generale e della medicina di laboratorio in particolare.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: Expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
2. Januzzi JL Jr, Mahler SA, Christenson RH, et al. Recommendations for institutions transitioning to high-sensitivity troponin testing. JAAC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:1059-77.
3. Aspromonte N, Gulizia MM, Clerico A, et al. ANMCO/ELAS/SIBioC Consensus Document: biomarkers in heart failure. *Eur Heart J Suppl* 2017;19(Suppl D):D102-D112.
4. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
5. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
6. Clerico A, Zaninotto M, Masotti S, et al. Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio. Documento congiunto del Gruppo di Studio Biomarcatori Cardiovascolari di SIBioC-Medicina di Laboratorio ed European Ligand Assay Society (ELAS). *Biochim Clin* 2018;42:155-66.
7. Clerico A, Zaninotto M, Graziani MS, et al. Quality specifications, terminology and definition of the methods for the measurement of cardiac troponins. *Biochim Clin* 2018; 42:343-46.
8. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of the

- analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e229-e231.
9. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL-2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e174-e176.
 10. Clerico A, Zaninotto M, Padoan A, et al. Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cTnI and cTnT: From theory to practice. *Adv Clin Chem* 2019;93:239-62.
 11. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high sensitivity cTnI method: A multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
 12. Clerico A, Masotti S, Musetti V, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of the hs-cTnI method using ADVIA Centaur XPT platform: A multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;495:161-6.
 13. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Evaluation of 99th percentile and reference change values of a high-sensitivity cTnI method: A multicenter study. *Clin Chim Acta* 2019;493:156-61.
 14. Ndreu R, Musetti V, Masotti S, et al. Evaluation of reproducibility of the cTnT immunoassay using quality control samples. *Clin Chim Acta* 2019;495:269-70.
 15. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performances using standardized analytical protocols and comparison of clinical results of the new ADVIA BNP and NT-proBNP immunoassays for the Centaur XPT platform. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:911-7.
 16. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of reference change values for a hs-cTnI immunoassay using both plasma samples of healthy subjects and patients and quality control samples. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:e241-e243.
 17. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: A multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 18. Masotti S, Musetti V, Aloe R, et al. Evaluation of 99th percentile value of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chim Acta* 2019;496:45-7.
 19. Clerico A, Zaninotto M, Padoan A, et al. Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cTnI and cTnT: From theory to practice. On the behalf of the Study Group on Cardiovascular Risk Biomarkers of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC) and the Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS). *Adv Clin Chem* 2019;93:239-62.
 20. Clerico A, Zaninotto M, Padoan A, et al. Harmonization of two hs-cTnI methods based on recalibration of measured quality control and clinical samples. *Clin Chim Acta* 2020;510:150-6.
 21. Clerico A, Zaninotto M, Passino C, et al. Evidence on clinical relevance of cardiovascular risk evaluation in the general population using cardio-specific biomarkers. *Clin Chem Lab Med* 2020; doi: 10.1515/cclm-2020-0310.
 22. Clerico A, Cardinale DM, Zaninotto M, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and T methods for the early detection of myocardial injury in patients on chemotherapy. *Clin Chem Lab Med* 2020; doi: 10.1515/cclm-2020-0362.
 23. Cardinale DM, Zaninotto M, Cipolla CM, et al. Cardiotoxic effects and myocardial injury: the search for a more precise definition of drug cardiotoxicity. *Clin Chem Lab Med* 2020; doi: 10.1515/cclm-2020-056.
 24. Storti S, Zaninotto M, Musetti V, et al. Le troponine I e T sono biomarcatori cardiaci interscambiabili? *Biochim Clin* 2020; 44(SS1):S8-S16.
 25. Passino C, Zaninotto M, Masotti S, et al. La misura combinata dei biomarcatori cardio-specifici è utile nei pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari. *Biochim Clin* 2020; 44(SS1):S17-S31.
 26. Clerico A, Zaninotto M, Musetti V, et al. Calcolo e valutazione dei valori di riferimento della troponina cardiaca I (cTnI) misurata in un gruppo di volontari sani italiani con metodi immunometrici ad alta sensibilità: uno studio multicentrico. Studio promosso dal Gruppo di Studio Inter-Societario dei Marcatori Cardiaci della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) e dalla Sezione Italiana della European Ligand Assay. *Biochim Clin* 2020; 44(SS1):S32-S47.
 27. Zaninotto M, Clerico A, Plebani M. Patologie cardiovascolari e troponine cardiache: la storia di un legame indissolubile. *Biochim Clin* 2020;44(SS1):S67-S73.
 28. Aspromonte N, Zaninotto M, Padoan A, et al. Valutazione del rischio cardiovascolare e del danno cardiaco asintomatico nella popolazione generale utilizzando la misura della troponina cardiaca con metodi ad alta sensibilità. Documento del Gruppo di Studio Inter-societario sui Biomarcatori Cardiaci. *Biochim Clin* 2020;44(SS1):S86-S96.
 29. Passino C, Aimo A, Masotti S, et al. Cardiac troponins as biomarkers for cardiac disease. *Biomark Med* 2019;13:325-30.
 30. Welsh P, Preiss D, Hayward C, et al. Cardiac troponin T and troponin I in the general population. Comparing and contrasting their genetic determinants and associations with outcomes. *Circulation* 2019;139:2754-64.
 31. Farmakis D, Mueller C, Apple FS. High-sensitivity cardiac troponin assays for cardiovascular risk stratification in the general population. *Eur Heart J* 2020 doi: 10.1093/eurheartj/ehaa083.
 32. Cardinale D, Biasillo G, Salvatici M, et al. Using biomarkers to predict and to prevent cardiotoxicity of cancer therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17:245-56.
 33. Cardinale D, Ciceri F, Latini R, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: A multicenter randomised trial comparing two strategies for guiding prevention with enalapril: The International CardioOncology Society-one trial. *Eur J Cancer* 2018;94:126-37.
 34. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
 35. Tang G, Wu Y, Zhao W, et al. Multiple immunoassay systems are negatively interfered by circulating cardiac troponin I autoantibodies. *Clin Exp Med* 2012;12:47-53.
 36. Savukoski T, Twarda A, Hellberg S, et al. Epitope specificity and IgG subclass distribution of autoantibodies to cardiac troponin. *Clin Chem* 2013;59:512-8.
 37. Savukoski T, Ilva T, Lund J, et al. Autoantibody prevalence with an improved immunoassay for detecting cardiac troponin-specific autoantibodies. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:273-9.
 38. Michielsen EC, Bisschops PG, Janssen MJ. False positive troponin result caused by a true macrotroponin. *Clin*

- Chem Lab Med 2011;49:923-5.
39. Wong, SL, Isserow S, Pudek N. Macro-troponin causing elevation in cardiac troponin I. *Can J Cardiol* 2014; 956:e5-e6.
 40. Warner JV, Marshall GA. High incidence of macro-troponin I with a high-sensitivity I assay. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1821-9.
 41. Kavsak PA, Roy C, Malinowski P, et al. Macrocomplexes and discordant high-sensitivity cardiac concentrations. *Ann Clin Biochem* 2018;55:500-4.
 42. Clerico A, Plebani M. Biotin interference on immunoassay methods: sporadic cases or hidden epidemic? *Clin Chem Lab Med* 2017;55:777-9.
 43. Frame IJ, Joshi PH, Mwangi C, et al. Susceptibility of cardiac troponin assays to biotin interference. *Am J Clin Pathol* 2019;151:486-93.
 44. Li MX, Wang X, Sykes BD. Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology. *J Muscle Res Cell Motil* 2004;25:559-79.
 45. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry* 2013;78:1447-65.
 46. M. Panteghini, Assay-related issues in the measurement of cardiac troponins, *Clin Chim Acta* 2009;402:88-93.
 47. Panteghini M, Pagani F, Yeo KT, et al. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50:327-32.
 48. Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Standardization of cardiac troponin I assays: round robin of ten candidate reference materials. *Clin Chem* 2001;47:471-7.
 49. Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, et al. Evaluation of standardization capability of current cardiac troponin I assays by a correlation study: results of an IFCC pilot project. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:677-90.
 50. Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Towards standardization of cardiac troponin I measurements. Part II: Assessing commutability of candidate reference materials and harmonization of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2006;52:1685-92.
 51. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
 52. Valentine CM, Tchong JE, Waites T. Translating the translation. What clinicians should know about the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2668-70.
 53. McCarthy C, Murphy S, Cohen JA, Rehman S, Jones-O'Connor M, Olshan DS, et al. Misclassification of myocardial injury as myocardial infarction implications for assessing outcomes in value-based programs. *JAMA Cardiol* 2019;4:460-4.
 54. Body R, Carlton E. Understanding cardiac troponin part 1: avoiding troponininitis. *Emerg Med J* 2018;35:120-5.
 55. Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1167-77.
 56. Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
 57. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;7:553-60.
 58. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, Ordonez-Lianos J; IFCC Task Force on Clinical Application of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem* 2017;63:73-81.
 59. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98-102.
 60. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015;161:1566-75.
 61. Hughes MF, Ojeda F, Saarela O, et al. Association of repeatedly measured high-sensitivity-assayed troponin I with cardiovascular disease events in a general population from the MORGAM/BiomarCaRE Study. *Clin Chem* 2017;63:334-42.
 62. Lyngbakken MN, Røsjø H, Oddgeir L. et al. Temporal changes in cardiac troponin I are associated with risk of cardiovascular events in the general population: The Nord-Trøndelag Health Study. *Clin Chem* 2019;65:871-81.
 63. Piepoli MF, Abreu A, Albus A, et al. Update on cardiovascular prevention in clinical practice A position paper of the Association of Preventive Cardiology of the European Society of Cardiology. *Eur J Prev Cardiol* 2020;27:181-205.
 64. Mingels AM, Cardinaels EP, Broers NJ, van Sleuwen A, Streng AS, van Diejen-Visser MP, et al. Cardiac troponin T: Smaller molecules in patients with end-stage renal disease than after onset of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2017;63:683-90.
 65. Vroemen WHM, Mezger STP, Masotti S, Clerico A, Beckers O, de Boer D, et al. Cardiac Troponin T: Only small molecules in recreational runners after marathon completion. *J Am Lab Med* 2019;3:909-13.

Revisione e aggiornamento del documento di consenso SIBioC per la ricerca e quantificazione della proteina di Bence Jones

Patrizia Natali¹, Giovanni Cigliana², Marcella Savoia³, Silvia Gelsumini⁴, Umberto Basile⁵, Arialdo Vernocchi⁶, Maria Stella Graziani⁷, Michele Mussap⁸, Giovanni Palladini⁹

¹Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero Universitaria e Azienda Sanitaria Locale di Modena

²Patologia Clinica, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, IRCCS, Roma

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

⁴UOC SMeL2 Analisi Chimico Cliniche ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

⁵Dipartimento Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario A. Gemelli, IRCCS Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

⁶Servizio di Medicina di Laboratorio, IRCCS MultiMedica, Milano

⁷Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

⁸Medicina di Laboratorio, Unità di laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche - Università di Cagliari

⁹Policlinico San Matteo, IRCCS - Pavia

ABSTRACT

Update of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC) Consensus document on the detection and quantification of the Bence Jones protein.

Bence Jones protein (BJP) refers to urine monoclonal free immunoglobulin light chains produced by the clonal expansion of a plasma cell in the bone marrow. BJP is strongly associated with systemic amyloidosis AL, light chain deposition disease, and multiple myeloma; less frequently, BJP may be recognized either in patients with monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS) and with other plasma cell dyscrasias or in patients with malignant non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. This paper contains updated recommendations for the detection and the measurement of BJP in clinical practice from the Working Group "Proteins" of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC), with specific indications for improving all the steps of the preanalytical, analytical, and postanalytical phases. The first morning void is the urine sample recommended for BJP detection, while 24-hours urine collection is preferred for BJP quantification. Native urine cannot be used for samples with low or very low content in urine total protein; in these cases, samples should be concentrated by using specific disposables, such as ultrafiltration membranes retaining proteins with molecular weight around 10 kDa. The required degree of concentration may vary according to sensitivity of the electrophoretic method utilized and the protein content of the sample. The detection of BJP may be performed directly by the recommended method agarose gel immunofixation (IFE) with specific polyvalent immunoglobulin antisera IgG-IgA-IgM, total κ and λ light chains; alternatively, an electrophoretic screening may be acceptable to rule out negative test results. However, positive test results should be confirmed by IFE. Tests based on immunometric methods can be used neither as screening test, nor for the BJP quantification; however, it could be useful for monitoring purposes, provided that the renal function of the patient is preserved. BJP measurement should be performed by the densitometric scanning of the electrophoretic peak corresponding to BJP, and results should be expressed as ratio of the BJP peak percentage to the urine total protein. Test results should be always integrated by standardized interpretative comments included in the laboratory reports.

INTRODUZIONE

La ricerca, la caratterizzazione e la quantificazione della proteina di Bence Jones (PBJ) è fondamentale per

l'inquadramento e il monitoraggio del paziente affetto da discrasia plasmacellulare (DP) (1-7). Le DP sono un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate dalla proliferazione di un singolo clone di cellule B che

Corrispondenza a: Giovanni Palladini, Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCSPoliclinico San Matteo, Viale Golgi, 19, 27100 Pavia, Tel +39-0382-502994, E-mail giovanni.palladini@unipv.it

Ricevuto: 16.07.2020

Revisionato: 17.07.2020

Accettato: 27.08.2020

Pubblicato on-line: 16.10.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.084

produce un unico tipo di immunoglobulina (Ig) o di catena leggera libera (CLL) strutturalmente uniformi, che si evidenziano all'elettroforesi con una banda omogenea o componente monoclonale (CM), se presente in quantità sufficiente. In condizioni fisiologiche, durante la sintesi delle Ig, si produce un lieve eccesso di CLL policlonali di tipo κ o λ che, per il loro basso peso molecolare, vengono rapidamente eliminate dal rene e pertanto hanno una breve emivita plasmatica (2-6 ore) (8). Le CLL sono infatti liberamente filtrate dal glomerulo e riassorbite per oltre il 99% dal tubulo contorto prossimale; nelle urine del soggetto sano le CLL sono presenti in tracce (9). Nel paziente affetto da DP, le CLL monoclonali possono raggiungere concentrazioni elevate in circolo, al punto da superare la capacità di riassorbimento del tubulo (1-30 g/die) (3) ed essere quindi escrete con l'urina, dando così origine alla PBJ (10-12).

La ricerca della PBJ rappresenta una delle prime determinazioni messe a punto nel laboratorio clinico ed è anche uno degli esami che ha subito nel tempo modifiche rilevanti della procedura analitica. Tuttavia, nonostante gli sforzi per migliorare le prestazioni analitiche dei metodi, a tutt'oggi l'esame presenta diverse criticità, tra cui: una scarsa standardizzazione; la mancanza di un metodo definitivo impiegabile nella pratica routinaria; la difficoltà di ottenere determinazioni quantitative affidabili e ripetibili, soprattutto perché strettamente dipendenti da una misura accurata della concentrazione della proteinuria totale.

Il presente documento ha lo scopo di descrivere lo stato dell'arte e di aggiornare le raccomandazioni già disponibili (10,11) sulle corrette procedure da applicare nelle fasi pre-, post- e analitica, tenuto conto

dell'importanza clinica del risultato e della necessità di armonizzare l'uso di questo esame con quello degli altri disponibili per la gestione del paziente affetto da DP. Il ruolo del laboratorio si rivela quindi cruciale quale parte integrante del processo decisionale clinico (13).

APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA

Il miglioramento continuo dell'appropriatezza della richiesta è fortemente raccomandato allo scopo di permettere al laboratorio di usare metodi ad elevata affidabilità in popolazioni di pazienti selezionate, evitando l'uso di metodi meno costosi ma meno sensibili proposti dal mercato per risparmiare risorse economiche e carico di lavoro. La richiesta appropriata e il mantenimento di una sensibilità diagnostica elevata sono fondamentali per non perdere pazienti con malattie che possono essere rapidamente fatali se non trattate tempestivamente.

La presenza della PBJ si riscontra in diverse malattie immunoproliferative, tra cui le più frequenti sono:

- Gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS)
- Gammopatie monoclonali di significato clinico (MGCS) (14,15)
- Mieloma asintomatico o smoldering (SMM)
- Mieloma multiplo (MM)
- Macroglobulinemia di Waldenström (MW)
- Amiloidosi AL
- Malattia da deposito di catene leggere (LCDD)

La PBJ si può osservare più raramente anche in altre patologie linfoproliferative (15-17), tra cui alcuni linfomi e nelle leucemie linfatiche croniche.

La ricerca della PBJ è particolarmente rilevante nelle malattie da piccoli cloni, come l'amiloidosi AL e la LCDD;

Tabella 1

Indicazione per la ricerca e per la quantificazione della proteina di Bence Jones.

Condizioni	Ricerca	Quantificazione	Bibliografia rilevante
Riscontro occasionale di una CM	SI*		GdS Proteine SIBioC 2008 (27)
MGUS	SI*		IMWG 2009 (3)
SMM	SI	SI	IMWG 2014 (28)
MM (diagnosi e monitoraggio)	SI	SI	IMWG 2014 (28)
Ipogammaglobulinemia non attesa nell'adulto	SI		GdS Proteine SIBioC (27)
Sospetto clinico di malattie "da piccolo clone" (amiloidosi AL, LCDD, ecc.) diagnosi e monitoraggio	SI		IMWG 2009 (3) Raccomandazioni australiane (7)
Macroglobulinemia di Waldenström	SI**		(21-25)
Idoneità all'impiego del mezzo di contrasto	NO		Documento di consenso SIRM – SIBioC (26)

*È preferibile la quantificazione delle catene leggere libere circolanti. La ricerca della proteinuria di Bence Jones in questo caso è raccomandata solo nei laboratori che non eseguono la determinazione delle catene leggere libere plasmatiche (3,16,29).

** Non esiste in letteratura consenso unanime.

CM, componente monoclonale; MGUS, gammopatia monoclonale di incerto significato; SMM, mieloma asintomatico o smoldering; MM, mieloma multiplo; LCDD, malattia da deposito di catene leggere; GdS, gruppo di studio; IMWG, International Myeloma Working Group; SIRM, Società Italiana di Radiologia Medica.

la sua aggiunta agli esami diagnostici di base, ne aumenta in modo significativo la sensibilità diagnostica (16-20).

La determinazione della PBJ è essenziale nella fase di diagnosi e inquadramento clinico delle DP, nella verifica dell'efficacia terapeutica e del tipo di risposta alla terapia e in tutte le fasi del percorso assistenziale dell'amiloidosi AL. La quantificazione è importante nella definizione della diagnosi di SMM e nella valutazione della risposta alla terapia nel MM. Per quanto riguarda la MW, non esiste in letteratura un accordo unanime circa l'utilità della determinazione della PBJ, sia per la diagnosi che per il monitoraggio della patologia (21-25). In mancanza di un consenso chiaro ed esplicito, vale la prassi locale, secondo le regole della buona pratica assistenziale. Sulla scorta del documento congiunto della Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) e SIBioC (26) la ricerca della PBJ non è indicata nella valutazione del rischio renale per i pazienti da sottoporre a indagine radiologica con mezzo di contrasto.

Le condizioni nelle quali è appropriato richiedere la ricerca della proteinuria di Bence Jones sono elencate nella Tabella 1. È importante che il laboratorio promuova un costante dialogo con gli specialisti ematologi, al fine di evitare una richiesta inappropriata.

INDICAZIONI PER IL LABORATORIO

Fase pre-analitica

Il tipo di campione raccolto, l'eventuale necessità di un suo pre-trattamento (30) e la misurazione delle proteine totali urinarie (31) rappresentano elementi di criticità nella standardizzazione del processo preanalitico con ricadute da non sottovalutare sulla determinazione quantitativa della PBJ.

Prima dell'analisi chimica e immunochimica, per ridurre le interferenze preanalitiche e analitiche dovute a cristalli, batteri, cellule, muco ed altri materiali in sospensione, è opportuno sottoporre i campioni di urina a centrifugazione da 1000 a 2000 g per 5-10 minuti (32,33).

Tipo di campione

Occorre precisare che le recenti linee guida Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (34) sulla malattia renale cronica e sulla malattia renale acuta raccomandano il campione di urina della prima minzione del mattino per la determinazione dell'albuminuria e della proteinuria totale, esprimendo il risultato in rapporto all'escrezione urinaria di creatinina. Al contrario, i documenti di consenso e le linee guida più rappresentativi dell'IMWG (2,28,35,36) raccomandano la raccolta delle 24 ore per la quantificazione della PBJ, in particolare nella determinazione della risposta alla terapia. Appare quindi ragionevole l'uso del campione della prima minzione del mattino per la ricerca e raccomandabile l'uso del campione della raccolta delle 24 ore per la quantificazione, avendo cura di mantenere

l'urina refrigerata durante la fase di raccolta fino all'arrivo in laboratorio per evitare la degradazione batterica della proteina.

Indicazione I. Tipo di campione

- Ricerca: prima minzione del mattino
 - Quantificazione: campione delle 24 ore
-

Concentrazione delle urine

Nell'ambito della ricerca della PBJ, la concentrazione del campione urinario è suggerita quando non è possibile, con i metodi a disposizione, raggiungere il limite raccomandato di sensibilità di 10 mg/L (7,10,11) e quando, a fronte di un preciso sospetto diagnostico, anche l'immunofissazione può non essere in grado di rilevare la presenza di PBJ su campione nativo.

Non è descritto in letteratura un metodo unico per concentrare le urine al fine della determinazione della PBJ. Alcuni Autori indicano di concentrare le urine a partire da un fattore 10 (10x) fino a un fattore 200 (200x) (7,37-41), mentre altri suggeriscono di valutare preventivamente la concentrazione delle proteine totali urinarie per poi usare un fattore di concentrazione variabile al variare della proteinuria (16,37,39).

Poiché la massa molecolare della PBJ oscilla intorno ai 22 kDa, il dispositivo per concentrare le urine deve essere in grado di trattenere le proteine con massa molecolare intorno a 10 kDa (7,10,11,38). I metodi di concentrazione centrifughi, dotati di membrane porose, dialitiche o desalificanti, consentono di ottenere buoni risultati, rispettando il più possibile la natura della proteina (11,42). È da notare peraltro che qualsiasi modalità di concentrazione può portare alla perdita di materiale in modo non lineare. In particolare, sono da evitare i metodi di concentrazione per adsorbimento (43) che non garantiscono l'integrità delle catene polipeptidiche. È importante evidenziare che i metodi di desalficazione del campione non comportano necessariamente la sua concentrazione.

Indicazione II. Concentrazione delle urine

- Il dispositivo deve trattenere molecole di 10 kDa (circa)
 - Evitare i metodi per adsorbimento
 - Qualsiasi metodo può comportare perdita di materiale
-

Determinazione della proteinuria totale

I metodi per la determinazione delle proteine totali urinarie rappresentano una criticità nel laboratorio clinico, perché sono inaccurati, non riferibili, affetti da interferenze e scarsamente ripetibili, soprattutto a causa del contenuto eterogeneo e altamente variabile di proteine e polipeptidi nelle urine. Inoltre, come noto, la proteinuria può variare considerevolmente in base allo stato d'idratazione del soggetto. Tra i vari metodi

disponibili, i più usati nella pratica di laboratorio sono quelli colorimetrici (pirogallolo rosso molibdato, pirocatecolo violetto molibdato, blu di Coomassie). Non pochi laboratori usano tuttavia metodi turbidimetrici o nefelometrici basati sulla reazione delle proteine nel campione di urina con reagenti chimici, come il benzetonio cloruro o l'acido tricloroacetico. Purtroppo, tutti i metodi commerciali attualmente disponibili impiegano reagenti che posseggono affinità di legame diverse per le varie proteine urinarie; ciò comporta un grado di inaccuratezza delle misure che varia al variare della composizione proteica presente nel campione. L'albumina è la proteina che possiede la maggiore affinità di legame con i vari coloranti; al contrario, la PBJ possiede una bassa affinità di legame e per tale motivo proteinurie anche cospicue caratterizzate da prevalente presenza di PBJ possono essere sottostimate (7). Inoltre, l'elevata eterogeneità molecolare intra- e inter-individuale della PBJ può dare origine ad un legame non lineare con il reagente, causando la perdita di accuratezza della misura che, a sua volta, si ripercuote sulla quantificazione densitometrica della PBJ (7,11,44-46). I metodi in chimica secca (strisce reattive) sono diffusissimi per la loro semplicità e facilità interpretativa; si tratta di determinazioni semi-quantitative basate su una scala di colore e potenzialmente affette da interferenze dovute alla presenza di cataboliti occasionalmente presenti nell'urina e derivanti da farmaci o da cibi assunti prima dell'esame. La limitazione più rilevante di questi metodi è che raramente sono in grado di svelare la presenza di proteinuria costituita quasi esclusivamente dalla PBJ. Per questi motivi, si sconsiglia l'uso di metodi in chimica secca per la quantificazione delle proteine totali urinarie (11,47,48).

Indicazione III. Proteine totali urinarie

- Si sconsiglia l'utilizzo delle strisce reattive (insensibili alla presenza della proteina di Bence Jones)

Fase analitica

Analisi qualitativa- Ricerca della proteina

L'analisi qualitativa è il primo approccio di laboratorio alla ricerca della PBJ e deve basarsi esclusivamente su metodi in grado di caratterizzare la morfologia monoclonale delle CLL nell'urina. Inoltre, deve basarsi su metodi combinati (elettroforesi e immunoprecipitazione) in grado di riconoscere il tipo di CLL monoclonale (κ o λ), differenziando le catene leggere monoclonali legate (immunoglobuline complete o parti) dalle CLL monoclonali libere. Ne consegue che nessun metodo all'infuori di quelli separativi in elettroforesi è in grado al momento di evidenziare la peculiarità della morfologia (monoclonale o policlonale) di CLL nell'urina. Recentemente sono stati proposti metodi ottimizzati in spettrometria di massa in grado di soddisfare questi criteri (49).

L'immunofissazione urinaria (uIFE) è considerata a tutt'oggi il metodo di riferimento per la ricerca della PBJ, consentendo di soddisfare i requisiti su esposti (36).

Esami di primo livello. L'esame ideale dovrebbe essere un esame immunoelettroforetico (su supporto solido o in capillare), su campione nativo che consenta il riconoscimento di una CM urinaria, dotato di un'elevata sensibilità (≤ 10 mg/L), semplice, rapido, poco costoso e, soprattutto, in grado di minimizzare i falsi negativi. Questo metodo purtroppo ancora non esiste, ma il mercato ha proposto vari metodi rapidi che tuttavia non sono esenti da criticità.

In letteratura sono stati descritti metodi di immunofissazione rapida da utilizzarsi come esame di primo livello che impiegano miscele di antisieri anti- κ e λ totali (talora in aggiunta anche antisieri anti IgG, IgA, IgM, anti-albumina e anti-alfa1 microglobulina) cimentati su un'unica corsia (40,50,51). Questi metodi consentirebbero di evidenziare i campioni negativi sottoponendo alla conferma in immunofissazione classica i campioni dubbi o positivi. I dati relativi presenti in letteratura sono ancora da considerarsi preliminari e necessitano di convalida su ampie casistiche e in popolazioni selezionate. Per tali motivi, non si ritiene che questi metodi possano sostituire l'uIFE classica su gel d'agarosio, né si ritiene che essi siano del tutto privi di possibilità di risultati falsi negativi, alla luce delle esperienze finora pubblicate. Tuttavia, nei pazienti in monitoraggio e con PBJ già nota al laboratorio, nel caso in cui l'esame di primo livello evidenzia una CM, si può ritenere confermata la PBJ diagnosticata in precedenza, a meno di mutate condizioni che inducano ad eseguire approfondimenti.

Immunofissazione urinaria (uIFE). È la tecnica raccomandata (3,5-7,10,11,35,36,38) per la ricerca e la diagnosi di PBJ e consente di rilevare la presenza di CLL monoclonali nelle urine, di caratterizzarle come κ o λ e di verificare contestualmente l'eventuale presenza di una Ig completa. È opportuno che ogni laboratorio raggiunga la sensibilità raccomandata, utilizzando, se necessario, tecniche di concentrazione del campione o sistemi di colorazione altamente sensibili come i coloranti colloidali (10,11,37,42,52). I più comuni kit per immunofissazione in commercio, secondo quanto dichiarato dai produttori, raggiungono la sensibilità richiesta senza necessità di concentrare il campione quando si utilizzino antisieri anti κ o anti λ totali. È comunque opportuno che ogni laboratorio verifichi la sensibilità analitica del metodo in uso, nel contesto della propria operatività.

Il campione di urina è deposto nel gel su tre corsie e cimentato con antisieri anti-GAM (miscela anti-IgG, IgA e IgM) e anti- κ e anti- λ totali. Gli antisieri anti catena leggera libera sono più costosi e meno sensibili a causa della loro scarsa avidità per l'antigene (7,10,11). La PBJ è presente nel campione analizzato quando si verifica la reazione con gli antisieri come rappresentato in Figura 1.

Qualora nel siero del paziente sia rilevata una CM con catene pesanti di tipo IgD o IgE, occorre inserire

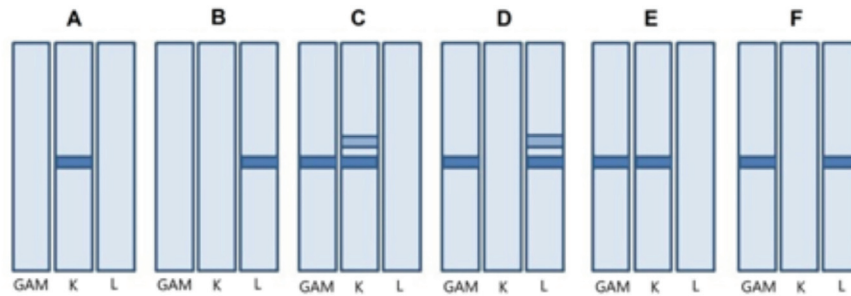


Figura 1. Immunofissazione su gel di agarosio per la determinazione della proteina di Bence Jones (PBJ)

Nella figura è schematizzata una immunofissazione urinaria su gel di agarosio a 3 corsie. Gli antisieri utilizzati sono anti-GAM (IgG, IgA, IgM), anti-catene κ e anti-catene λ totali. Sono raffigurate le diverse combinazioni in cui si può presentare una componente monoclonale nelle urine. A, campione positivo per PBJ tipo κ ; B, campione positivo per PBJ tipo λ ; C, campione positivo per PBJ tipo $\kappa + \text{Ig}\kappa$; D, campione positivo per $>\text{PBJ}$ tipo $\lambda + \text{Ig}\lambda$; E, $\text{Ig}\kappa$ (da verificare se si è in presenza di una PBJ- κ comigrante con una $\text{Ig}\kappa$); F, $\text{Ig}\lambda$ (da verificare se si è in presenza di una PBJ- λ comigrante con una $\text{Ig}\lambda$).

questi antisieri anche nel pannello dell'uIFE corrispondente (7)

Indicazione IV. Ricerca della proteina di Bence

- L'immunofissazione urinaria è la tecnica di elezione
- Gli esami di I livello sono da utilizzare con estrema cautela

Analisi quantitativa – Quantificazione della proteina

La determinazione quantitativa della PBJ pone numerosi problemi sia di natura strettamente analitica (non esiste alcun sistema analitico in grado di garantire una misura accurata della PBJ) sia di natura procedurale, in quanto questa determinazione non può prescindere dalla valutazione della proteinuria totale e dall'influenza di altre proteine urinarie come l'albumina. Tuttavia, la conoscenza del valore quantitativo di PBJ è un indice che possiede un valore clinico e pertanto il laboratorio deve porre molta attenzione nel cercare di ridurre i vari fattori che concorrono all'imprecisione del metodo, non potendone modificare l'inaccuratezza. La determinazione quantitativa rimane tuttavia un dato di laboratorio aggiuntivo e non sostituisce l'iter diagnostico costituito dall'identificazione elettroforetica di un picco monoclonale e dalla caratterizzazione all'uIFE del tipo di CLL monoclonale. In un algoritmo ideale, la quantificazione deve sempre essere preceduta da un riscontro qualitativo positivo (Figura 2).

Le principali raccomandazioni indicano la misura quantitativa nel campione di urina delle 24 ore (3,5–7,10,11,35,36,38); nel caso in cui non si disponga della raccolta delle 24 ore, la concentrazione di PBJ va rapportata alla creatinina urinaria (7,11,53). In quest'ultimo caso è raccomandata la prima minzione del mattino. Campioni estemporanei prelevati nell'arco della giornata, possono dar luogo a risultati fuorvianti a causa dell'influenza di svariati e numerosi fattori che incidono

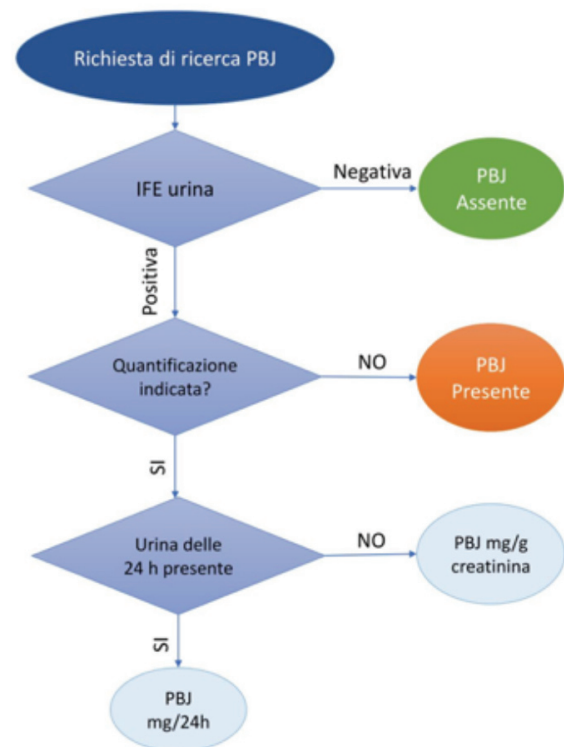


Figura 2. Algoritmo per la determinazione della proteina di Bence Jones.

IFE, immunofissazione; PBJ, Proteina di Bence Jones.

sul volume urinario e sulla concentrazione di soluti urinari, quali la temperatura esterna, l'attività fisica, il carico idrico, episodi febbrili, stress, e così via.

L'IMWG definisce il criterio di "misurabilità della malattia" quando è soddisfatto almeno uno dei seguenti requisiti: CM sierica superiore a 10 g/L, CLL coinvolta superiore a 100 mg/L in presenza di rapporto delle CLL circolanti alterato e PBJ superiore a 200 mg/24h (2). Se

Ellidag et al. (46) suggeriscono che ogni laboratorio determini il proprio limite di sensibilità, Tate et al. (7) individuano in 200 mg/L di proteine totali urinarie il limite al di sotto del quale la misurazione di PBJ risulta essere non sufficientemente accurata. D'altra parte, nei criteri di valutazione della terapia raccomandati dall'IMWG (35) è indicato nella risposta parziale molto buona (VGPR) che la PBJ sia inferiore a 100 mg/24h. Risulta quindi necessario raggiungere almeno questo livello di sensibilità.

Quantificazione densitometrica. È il metodo raccomandato (3,5-7,10,11,35,36,38). Si basa sulla valutazione dell'entità del picco monoclonale rilevato all'elettroforesi dell'urina (uELF), rapportata in percentuale alla quantità di proteine totali urinarie. Come già ricordato la misurazione delle proteine urinarie totali rappresenta una delle criticità di questa determinazione.

Sul campione di urine delle 24 ore, previa concentrazione se necessario, viene eseguita una uELF su gel di agarosio ad alta sensibilità, (High Resolution Agarose Gel Electrophoresis – HR AGE). Il colorante solitamente utilizzato è il violetto acido, o il blu di Coomassie; con questi coloranti la sensibilità del metodo può arrivare a 20-50 mg/L (54).

Il tracciato elettroforetico è poi sottoposto a scansione densitometrica. Il picco monoclonale individuato viene quindi delimitato e, tramite apposito software, viene calcolata in percentuale l'area sottesa che, moltiplicata per la concentrazione delle proteine totali sulle urine delle 24 ore, consente di ricavare la quantità di PBJ espressa in mg/24h (31,55). In alternativa, sulle urine del mattino, la concentrazione ricavata deve essere espressa in rapporto alla creatinina urinaria (7,11,53). Sono descritte due modalità per delimitare il picco monoclonale:

- Perpendicular Drop (PD), tecnica che integra l'area del picco delimitandola da due linee ortogonali tracciate dai punti di flesso alla linea base del grafico
- Tangent Skimming (TS), tecnica che integra l'area del picco delimitandola con una linea tangente tra i due punti di flesso.

Ognuno dei due metodi presenta vantaggi e svantaggi e non è possibile raccomandarne uno in particolare perché la loro accuratezza dipende dalla entità del picco monoclonale che si sta quantificando e dalla entità del fondo policlonale nel quale la CM stessa è inserita, nonché dalla possibile co-migrazione (o vicinanza) della CM con altre proteine fisiologicamente presenti (56,57). L'indicazione è comunque quella di eseguire la quantificazione di un campione sempre con lo stesso metodo, adottando all'interno del laboratorio regole precise e condivise per la delimitazione del picco.

Le varie frazioni proteiche separate in HR-AGE hanno una diversa affinità per il colorante (42), quindi, a parità di concentrazione, possono assumere densità ottiche differenti. Per valori elevati di proteinuria, infatti, non è lineare il rapporto tra la concentrazione delle proteine e l'intensità del picco a causa della saturazione dei siti di legame con le proteine del colorante e per

l'intrinseca ridotta linearità della tecnica densitometrica (42,57,58).

La struttura molecolare della PBJ è eterogenea e può causare una risposta non proporzionale alla sua concentrazione e con la possibilità di riscontrare picchi sdoppiati per i diversi gradi di polimerizzazione della molecola, rendendone così difficile la misurazione. Si può inoltre verificare una co-migrazione con una Ig completa, nel qual caso è impossibile distinguere le due entità. Per esempio, se la PBJ migra in zona beta1, potrebbe sovrapporsi alla transferrina, quando presente. Nel caso di concentrazioni elevate di PBJ, tale eventualità incide relativamente poco sulla valutazione quantitativa; al contrario, per basse concentrazioni di PBJ migrante in zona beta-1 associate alla presenza di transferrina, la misura quantitativa diventa ancor più inaccurata. Nei casi in cui una piccola PBJ migri in zona beta-1, sarebbe auspicabile valutare la quantità di transferrina con un metodo immunochimico. Infine, la presenza di proteinuria mista in campioni con concentrazioni elevate di proteine totali urinarie rende difficile la misura della PBJ perché in questi casi le Ig policlonali ed altre proteine si sovrappongono, aumentando la linea di base del tracciato elettroforetico e amplificando quindi il "rumore di fondo" che rende problematica l'individuazione e la misurazione del picco PBJ (31).

L'esecuzione dell'uELF, necessaria per la quantificazione della PBJ, consente di evidenziare anche il tipo di proteine presenti nel campione, offrendo l'opportunità di indicare al curante un'eventuale proteinuria glomerulare, tubulare o mista per una valutazione della funzionalità renale del paziente (7).

Nonostante il mercato stia proponendo sistemi in automazione sia per l'uELF che per la lettura densitometrica delle frazioni proteiche urinarie (59), a tutt'oggi la separazione elettroforetica delle proteine urinarie, sia con tecniche su supporto solido che in capillare, rimane un esame che richiede ancora una componente di manualità; ciò implica tempi analitici relativamente lunghi e necessità di risorse umane dedicate.

Quantificazione in elettroforesi capillare zonale. Attualmente, non è ancora messo a punto un sistema affidabile in elettroforesi capillare zonale (CZE) per l'uELF e l'immunotipizzazione della PBJ. Esistono modifiche del metodo per la CZE sierica, ma gli ostacoli principali sono di due tipi: la difficoltà di analizzare campioni con basse concentrazioni di proteine e la presenza di molte sostanze non proteiche che interferiscono nella qualità e nella risoluzione della separazione elettroforetica. Questi problemi non sono stati finora completamente risolti dall'impiego di metodi di pre-trattamento del campione urinario, ed anzi questi metodi, finalizzati per lo più alla sola rimozione (quasi sempre parziale) di sali, sono molto lunghi, complessi e costosi (60). Tuttavia, il metodo CZE può essere usato solo dopo pre-trattamento del campione.

La sensibilità del metodo, teoricamente superiore a quella del metodo densitometrico, è intorno ai 7-12 mg/L

per campioni con concentrazione di proteine totali urinarie ≥ 100 mg/L; al di sotto di questo valore l'elettroferogramma può non essere interpretabile (60,61). Fino a quando il mercato non renderà disponibile un sistema in completa automazione capace di integrare la fase preparativa con quella analitica per ottenere tracciati ad elevata risoluzione separativa e raggiungere sensibilità analitiche intorno ai 10 mg/L per la PBJ, il metodo in CZE risulterà non ottimale nell'applicazione in laboratorio, soprattutto per la caratterizzazione immunotipica della PBJ.

Quantificazione immunochimica. È opportuno premettere che la determinazione immunonefelometrica o immunoturbidimetrica delle catene leggere totali (cioè legate + libere) urinarie, così come è riconosciuto per le catene leggere totali sieriche, fornisce un dato non adeguato al monitoraggio della DP. L'impiego degli antisieri anti catene leggere totali, non consente infatti di distinguere analiticamente le catene leggere legate all'Ig, dalle libere (62,63). Gli antisieri anti CLL legano selettivamente le CLL urinarie sia mono che policlonali. Questa misura tuttavia è ampiamente sconsigliata in letteratura da vari Autori (3,5,7,10,11,54) a causa appunto dell'impossibilità dei metodi immunochimici di distinguere le CLL monoclonali dalle policlonali. Ciò può provocare una sovrastima della concentrazione di CLL urinarie (7,64). Molte altre sono peraltro le problematiche riscontrabili nella determinazione delle CLL con metodi immunochimici. Anzitutto, ogni clone plasmacellulare iper-secerne produce un'immunoglobulina atipica e unica, che si differenzia nella sua struttura primaria e secondaria dalle immunoglobuline normalmente secrete dalle plasmacellule; conseguentemente, le CLL monoclonali sono diverse da paziente a paziente. Inoltre, i calibratori e i controlli possono essere policlonali pur dovendo misurare nel campione CLL monoclonali. Laddove anche si usino reagenti monoclonali, rimane la mancanza di un calibratore standard internazionale a cui riferirsi e permane comunque la mancanza di parallelismo tra calibratore e misurando (65-69). Esiste poi una discreta variabilità tra lotti; non c'è confrontabilità tra metodi che utilizzano anticorpi monoclonali e policlonali (67), ed infine, l'insidia maggiore è rappresentata dall'effetto prozona che si verifica quando, in condizione di eccesso di antigene, l'immunocomplesso si discioglie producendo un dato falsamente negativo (64). I più recenti analizzatori - turbidimetri o nefelometri - tuttavia, sono in grado di rilevare l'effetto prozona con tecniche in automazione grazie al collegamento con software in grado di riconoscere e gestire l'eccesso di antigene applicando al campione diluizioni seriali fino al conseguimento di un dato conforme alla diluizione applicata (70-72). Pur essendo tali strumenti affidabili, è sempre necessario che l'operatore controlli la coerenza del dato ottenuto con la storia del paziente ed eventualmente proceda con diluizioni di conferma.

La misurazione delle CLL non fornisce propriamente un'indicazione sulla concentrazione della PBJ, in quanto

sono contemporaneamente rilevate anche le CLL policlonali. Qualora si ritenga di procedere con tale misurazione, questa deve sempre essere associata ad una preliminare uFE, che confermi la presenza di CLL monoclonali. In questo caso, la contestuale misura immunometrica delle CLL urinarie può rappresentare un supporto nel monitoraggio della risposta alla terapia, a patto che la funzione renale del paziente sia conservata (73-76). Infatti, nel caso di proteinuria mista o comunque di alterata permeabilità glomerulare, le CLL policlonali sono tra le prime proteine a passare nell'urina, influenzando il risultato della determinazione immunometrica delle CLL.

La valutazione quantitativa immunochimica delle CLL presenta alcune proprietà significative: un'elevata sensibilità (< 1 mg/L) (73,77), un ampio intervallo di misura, sia per il limite inferiore che superiore di linearità, la possibilità di usare campioni nativi (urine non concentrate) ed infine l'assenza di interferenze da eventuale presenza di Ig complete o altre proteine sul risultato (78).

Il diverso catabolismo delle CLL κ e λ , specialmente in soggetti affetti da nefropatia, così come un'eventuale biconalità κ e λ (78), potrebbero provocare una falsa alterazione o una falsa normalizzazione del rapporto κ/λ delle CLL (54). Per tale motivo alcuni Autori (73-76) suggeriscono di non calcolare il rapporto κ/λ delle CLL urinarie, esprimendo il dato in mg/24h o in riferimento alla creatinina urinaria (mg/g creatinina). Alla luce delle evidenze sopra riportate, il rapporto κ/λ nell'urina può essere fuorviante e pertanto si raccomanda di non eseguire tale calcolo e di non riportare il dato nel referto, anche nei casi in cui il rapporto κ/λ sia calcolato automaticamente dallo strumento analitico.

La misurazione delle CLL nelle urine del mattino, d'altro canto, evita le criticità derivanti dalla concentrazione del campione, dalla misura delle

Indicazione V. Quantificazione della proteina di Bence Jones

- La quantificazione densitometrica è la tecnica raccomandata
 - La quantificazione in elettroforesi capillare zonale non è ancora consolidata
 - La quantificazione immunochimica può essere utilizzata se preceduta da una immunofissazione di conferma della positività per proteina di Bence Jones; può essere vantaggiosamente utilizzata per monitoraggio
 - Non calcolare e non riportare nel referto il rapporto κ/λ delle CLL
-

proteine totali urinarie e dalla raccolta delle 24 ore.

Fase post-analitica

Nell'ambito delle DP esistono molte linee guida, raccomandazioni e documenti di consenso, nazionali ed internazionali, relativi agli aspetti metodologici, diagnostici, di valutazione della stadiazione, del

monitoraggio e del trattamento terapeutico, mentre poco appare in letteratura circa le modalità di refertazione dei parametri analizzati, pur essendo l'interpretazione dei risultati parte integrante delle attività del laboratorio. Come evidenziato da alcune indagini conoscitive (79), esistono notevoli difformità tra le modalità operative e di refertazione adottate nei vari laboratori e spesso si riscontrano sostanziali differenze nel contenuto e nella struttura dei referti prodotti. È auspicabile che si faccia ogni sforzo per armonizzare il referto di laboratorio, per rendere più facile il confronto tra strutture diverse. Infatti eventuali difformità possono dare origine ad errori interpretativi da parte dei clinici curanti (79,80). In tale scenario, alcuni autori Canadesi hanno proposto, sia per l'elettroforesi che per l'immunofissazione sierica e urinaria, dei referti "sinottici" di più facile interpretazione (81).

Il referto

Il referto deve contenere dati chiari, facilmente fruibili dal clinico e accompagnati da brevi commenti interpretativi. È fortemente auspicabile una standardizzazione dei commenti interpretativi al fine di armonizzare il referto con quello di altri laboratori. Come per altri esami di laboratorio, al nome dell'esame deve essere associato il metodo (ad esempio: elettroforesi urinaria, metodo in gel d'agarosio ad elevata risoluzione). Il referto non deve contenere dati ridondanti, che possono fuorviare il messaggio finale e, se del caso, deve fare riferimento ad eventuali esami aggiunti dal laboratorio (esami riflessi).

Il referto dovrà includere le seguenti informazioni:

Se si tratta di analisi qualitativa, finalizzata a verificare la presenza o l'assenza della PBJ, l'intestazione del referto sarà:

RICERCA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES

Riportare nel referto:

- la tipologia di campione impiegato (prima minzione del mattino)
 - il metodo impiegato (immunofissazione su gel di agarosio) e la sua sensibilità espressa in mg/L ed eventuale concentrazione del campione
- Risultato (esempi):
- Positiva, catene leggere libere monoclonali di tipo k (o λ)
 - Negativa, assenza di catene leggere libere monoclonali
 - Positiva, catene leggere libere monoclonali di tipo k (o λ). Si segnala la presenza di una componente monoclonale IgX (k o λ)
 - Negativa, assenza di catene leggere libere monoclonali. Si segnala la presenza di una componente monoclonale CM IgX (k o λ)
 - Positiva per catene leggere libere monoclonali di tipo k e positiva per catene leggere libere monoclonali di tipo λ .

Se si tratta di analisi quantitativa finalizzata alla misura della PBJ (eseguita solo se clinicamente indicato e dopo l'analisi qualitativa), l'intestazione del referto sarà.

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES

Riportare nel referto:

- Tipologia di campione (ad esempio: urine delle 24 ore)
- Diuresi (mL/24h)
- Misura della concentrazione delle proteine totali urinarie (mg/L) con relativo metodo
- Metodo analitico (ad esempio scansione densitometrica)
- Risultato della misura (ad esempio xxx mg/24h)

Quando la PBJ, pur rilevata con l'analisi qualitativa, è in quantità così esigua da non essere misurabile, va segnalata come presente ma inferiore al limite di sensibilità quantitativo stabilito dal laboratorio.

Esempi di referto sono riportati in appendice.

Commento interpretativo

Il supporto dei documenti di consenso è indispensabile per raggiungere auspicati livelli di armonizzazione che permettano di uniformare il più possibile i risultati e i commenti interpretativi ad essi associati. I commenti devono essere chiari, concisi, rilevanti e non ambigui. Da evitare commenti che diano adito a fraintendimenti, come ad esempio:

Sospetta proteinuria di Benice Jones

Catene leggere libere urinarie di non chiara natura monoclonale

Probabile CM urinaria in attesa di tipizzazione

oppure segnalare la PBJ negativa quando inferiore ad una certa concentrazione espressa in mg/L, creando disorientamento circa la presenza/assenza della PBJ stessa (82).

Solo in casi particolari e in situazioni inaspettate, il commento va generato al momento ed il laboratorista deve essere in grado di fornire un commento inedito e specifico per la specifica situazione riscontrata (80,81,83).

Indicazione VI. Refertazione

Il referto deve contenere:

- il tipo di indagine (qualitativa o quantitativa)
 - il metodo usato e la sua sensibilità
 - il risultato (descrittivo se si tratta della ricerca; numerico se si tratta di quantificazione)
 - le unità di misura (se si tratta di quantificazione)
 - evitare commenti ambigui
-

CONCLUSIONI

La determinazione della PBJ è a tutt'oggi un esame di laboratorio di rilevante importanza clinica, sia nella gestione di alcune DP, come l'amiloidosi AL, la malattia da deposito di catene leggere e il mieloma non secernente, che nella fase di inquadramento clinico delle MGUS e MGCS e nella valutazione della risposta al trattamento terapeutico del mieloma multiplo. Negli ultimi 15-20 anni la determinazione della PBJ non ha subito sostanziali cambiamenti metodologici e gran parte delle raccomandazioni pubblicate in precedenza (10,11) sono tutt'ora valide e ribadite nel presente documento.

Gli elementi innovativi di questa raccomandazione possono essere riassunti in due aspetti peculiari: definire le caratteristiche e i limiti di nuove metodiche disponibili sul mercato, fornendo indicazioni sul loro eventuale uso da parte del laboratorio e definire gli strumenti per avviare il processo di armonizzazione delle fasi pre-analitica, analitica e post-analitica con particolare attenzione alla refertazione. Per quanto riguarda il primo aspetto, il gruppo di lavoro che ha sottoscritto questo documento richiama l'esigenza di basare le scelte metodologiche sulle caratteristiche qualitative del metodo e sulle evidenze della letteratura, privilegiando l'affidabilità analitica rispetto all'efficienza organizzativa, che è importante ma non vincolante. Altrettanto importante è l'indicazione su quando usare questi metodi, sui loro limiti e su come interpretare i loro risultati. Il secondo aspetto richiama l'esigenza di condividere algoritmi analitici tra laboratori e armonizzare l'espressione dei referti che, pur nella diversità, dovrebbero basarsi su una struttura comune e su commenti interpretativi codificati, al fine di trasmettere ai colleghi clinici e ai medici curanti informazioni chiare, semplici e il più possibile omogenee tra i vari laboratori (83-85). Questa sfida rappresenta l'elemento chiave per mantenere sempre aperta l'interfaccia con il medico curante e gli specialisti, includendo di fatto il laboratorio nel percorso assistenziale del paziente con DP. L'armonizzazione della diagnostica di laboratorio delle DP è anche un punto di aggregazione nell'acquisizione di diagnostici attraverso gare regionali o di area vasta, perché consente di dare forza e credibilità alla rete locale dei laboratori. È auspicabile che metodi emergenti, come la spettrometria di massa, entrino nella pratica routinaria, risolvendo problematiche ancora aperte come ad esempio la misura quantitativa della PBJ; tuttavia, sarà necessario ancora del tempo prima che metodi usati sperimentalmente come la spettrometria di massa possano essere alla portata di tutti i laboratori nella diagnostica delle DP. Pertanto, l'opportunità attuale consiste nell'usare al meglio gli strumenti a disposizione, azzerando, se possibile, il rischio di risultati falsi negativi e falsi positivi e offrendo la visione di un laboratorio clinico teso alla qualità e alla razionalizzazione delle risorse e dei consumi.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders. *Br J Haematol* 2003;121:749–57.
2. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467–73.
3. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215–24.
4. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48:1437–44.
5. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701–5.
6. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;117:4691–5.
7. Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49:242–56.
8. Albertini R, Merlini G. La misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero: Aspetti analitici e clinici. *Biochim Clin* 2010;34:26–9.
9. Beetham R, Wassell J, Wallage MJ, et al. Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies? *Ann Clin Biochem* 2007;44:516–22.
10. Graziani S, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2001;25:23–32.
11. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:338–46.
12. Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47–53.
13. Plebani M. Contenimento dei costi nel laboratorio clinico: razionamento o razionalizzazione? *Biochim Clin* 2016;40:123–8.
14. Fermand JP, Bridoux F, Dispenzieri A, et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: A novel concept with therapeutic implications. *Blood* 2018;132:1478–85.
15. Leung N, Barnidge DR, Hutchison CA. Laboratory testing in monoclonal gammopathy of renal significance (MGRS). *Clin Chem Lab Med* 2016;54:929–37.
16. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517–22.
17. Willrich MAV, Murray DL, Kyle RA. Laboratory testing for monoclonal gammopathies: Focus on monoclonal

- gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Clin Biochem* 2018;51:38–47.
18. Sayed RH, Wechalekar AD, Gilbertson JA, et al. Natural history and outcome of light chain deposition disease. *Blood* 2015;126:2805–10.
 19. Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem* 2009;55:499–504.
 20. Mollee P, Merlini G. Free light chain testing for the diagnosis, monitoring and prognostication of AL amyloidosis. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:921–7.
 21. Owen RG, Pratt G, Auer RL, et al. Guidelines on the diagnosis and management of Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2014;165:316–33.
 22. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinemia. *Br J Haematol* 2016;175:77–86.
 23. Vos JMI, Minnema MC, Wijermans PW, et al. Guideline for diagnosis and treatment of Waldenström's macroglobulinaemia. *Netherl J Med* 2013;71:54–61.
 24. Kastiris E, Leblond V, Dimopoulos MA, et al. Waldenström's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29:41–50.
 25. Gohar Maqbool M, Tam CS, Morison IM, et al. A practical guide to laboratory investigations at diagnosis and follow up in Waldenström macroglobulinaemia: recommendations from the Medical and Scientific Advisory Group, Myeloma Australia, the Pathology Sub-committee of the Lymphoma and Related Disease. *Pathology* 2020;52:167–78.
 26. Mussap M, Graziani MS, Caldini A, et al. Documento di consenso SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) sulla richiesta di esami di laboratorio per la valutazione del danno renale da mezzi di contrasto. *Biochim Clin* 2014;38:140–2.
 27. Graziani M, Dolci A, Greco C, et al. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48–51.
 28. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:538–48.
 29. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005;106:812–7.
 30. Lynch C, Lu ZX, Louey W, et al. Urine Bence-Jones protein analysis – to concentrate or not to concentrate. *Pathology* 2015;47:S84.
 31. Siegel DS, McBride L, Bilotti E, et al. Inaccuracies in 24-hour urine testing for monoclonal gammopathies. *Lab Med* 2009;40:341–4.
 32. Fogazzi GB, Garigali G. Collection, preparation and examination of the sample, and report of the urinary finding. Third. Elsevier srl, editor. Fogazzi GB -The urinary sediment. An integrated view. Milano; 2010:19–38 p.
 33. Lim K, Steinman TI, Hsiao L-L. Urinalysis. In: Elsevier Inc, editor. Singh AK, Loscalzo J. The Brigham Intensive Review of Internal Medicine E-book. Philadelphia, PA; 2019:678–90.
 34. KDIGO 2017 - Clinical Practice Guideline Update For The Diagnosis, Evaluation P an T of CKD-M and BD (CKD-M (CKD-M. Evidence Summary Tables. *Kidney International Supplements* 2017;7:1-59.
 35. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17:328–46.
 36. Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. *Leukemia* 2014;28:981–92.
 37. Beetham R. Detection of Bence-Jones protein in practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:563–70.
 38. Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK myeloma forum (UKMF) and nordic myeloma study group (NMSG): Guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J Haematol* 2009;147:22–42.
 39. Roden AC, Lockington KS, Tostrud LJ, et al. Urine protein electrophoresis and immunoelectrophoresis using unconcentrated or minimally concentrated urine samples. *Am J Clin Pathol* 2008;130:141–5.
 40. Jenner W, Klingberg S, Tate JR, et al. Combined light chain immunofixation to detect monoclonal gammopathy: A comparison to standard electrophoresis in serum and urine. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:981–7.
 41. Nakano T, Nagata A, Takahashi H. Ratio of urinary free immunoglobulin light chain kappa to lambda in the diagnosis of Bence Jones proteinuria. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:429–34.
 42. Mussap M. La ricerca della proteina di Bence Jones tra vecchi problemi e recenti raccomandazioni: considerazioni in margine alle linee guide italiane e americane. *Biochim Clin* 2002;26:49–54.
 43. Lindstedt G, Lundberg P-A. Loss tubular proteinuria pattern during urine concentration with commercial membrane filter cell (Minicon b-15 system). *Clin Chim Acta* 1974;56:125–6.
 44. Maisnar V, Tichy M, Stulik J, et al. The problems of proteinuria measurement in urine with presence of Bence Jones protein. *Clin Biochem* 2011;44:403–5.
 45. Marshall T, Williams KM. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. *Electrophoresis* 1999;20:1307–24.
 46. Ellidag HY, Curek G, Eren E, et al. The cutoff level for urine protein in urine immunofixation electrophoresis. *Clin Lab* 2015;61:1525–30.
 47. Mussap M, Merlini G. Pathogenesis of renal failure in multiple myeloma: Any role of contrast media? *Biomed Res Int* 2014;2014:1-10.
 48. Keren DF, Alexanian R, Goeken J, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:106–7.
 49. Milani P, Palladini G. La spettrometria di massa nella diagnosi e nel monitoraggio delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2019;43:256–63.
 50. Basile U, Gulli F, Torti E, et al. Evaluation of screening method for Bence Jones protein analysis. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:331–3.
 51. Natali P, De Santis E, Patelli G, et al. A new suggested approach in screening for Bence Jones protein and potential kidney damage. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:54–6.

52. Levinson SS, Keren DF. Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis. *Clin Chem* 1994;40:1869–78.
53. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma. *Br J Haematol* 2011;154:32–75.
54. Le Bricon T. Identification e dosage des proteines urinaires au labotatoire d'analyses. *Ann Biol Clin* 2002;60:525–40.
55. Caldini A, Graziani MS. La determinazione delle catene leggere libere nel siero può sostituire la ricerca e quantificazione della proteinuria di Bence Jones nella pratica clinica? *Biochim Clin* 2013;37:405–18.
56. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, et al. Reliability of M protein quantification: Comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:876–7.
57. Vernocchi A, Dolci A, Ceriotti F, et al. Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:199–207.
58. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, et al. Quantitation of serum monoclonal proteins: Relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem* 2009;55:1523–9.
59. Napodano C, Pocino K, Gulli F, et al. Comparison of fully automated and semiautomated systems for protein immunofixation electrophoresis. *J Clin Lab Anal* 2017;31:2017–8.
60. Mussap M, Ponchia S, Zaninotto M, et al. Evaluation of a new capillary zone electrophoresis system for the identification and typing of Bence Jones Protein. *Clin Biochem* 2006;39:152–9.
61. Russo F, Valentini V, Basset M, et al. Identification and quantification of urinary monoclonal proteins by capillary electrophoresis in AL amyloidosis. *Amyloid* 2017;24:66–7.
62. Journal B, Tietsche V, Hungria DM, et al. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia Review article Serum free light chain assays not total light chain assays are the standard of care to assess Monoclonal Gammopathies. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38:37–43.
63. Hungria VTM, Kampanis P, Drayson MT, et al. Comparison of kappa & lambda freelite to total kappa & lambda immunoassays for the detection of monoclonal gammopathies, both as standalone tests and alongside serum protein electrophoresis. *Blood* 2014;124:5705.
64. Tate J, Bazeley S, Sykes S, et al. Quantitative serum free light chain assay - analytical issues. *Clin Biochem Rev* 2009;30:131–40.
65. Graziani MS. Measurement of free light chains - Pros and cons of current methods. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1015–20.
66. Tate JR, Graziani MS, Mollee P, et al. Protein electrophoresis and serum free light chains in the diagnosis and monitoring of plasma cell disorders: laboratory testing and current controversies. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1–7.
67. Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1021–30.
68. Sasson SC, McGill K, Wienholt L, et al. Comparison of the Freelite serum free light chain (SFLC) assay with serum and urine electrophoresis/immunofixation and the N Latex FLC assay. *Pathology* 2015;47:564–9.
69. Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:489–95.
70. Ghillani P, Dufat L, Sterlin D, et al. Analytical performances of Optilite(R) turbidimeter (The Binding Site): a new dedicated analyser for specific proteins determination. *Ann Biol Clin* 2017;75:29–37.
71. Infusino I, Borille S, Panteghini M. Valutazione del sistema Optilite™ per la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero. *Biochim Clin* 2018;41:148–53.
72. Bossuyt X, Delforge M, Reynders M, et al. Antigen excess detection by automated assays for free light chains. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:235–8.
73. Pieri M, Pignalosa S, Franceschini L, et al. Nephelometric assay of urine free light chains: An alternative and early clinical test for Bence-Jones protein quantification. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:313–15.
74. Pieri M, De Stefano A, Franceschini L, et al. Minimal tumour burden in haematological diseases: a step forward with quantitative assessment of Bence-Jones in nephelometry? *Br J Haematol* 2016;175:733–5.
75. Lobe M, Pasquale D. Freelite for measurement of urine-free light chains in monoclonal gammopathies. *Am J Haematol* 2016;12:9–13.
76. Lobe M, Pasquale D. Serum versus urine free light chains for assessment of monoclonal gammopathies. *Blood* 2015;126:5307.
77. Delgado JC. Value of urinary free light chain testing for monitoring of bence jones proteinuria. *J Appl Lab Med* 2019;3:1059–60.
78. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673–80.
79. Terreni A, Caldini A, Graziani MS, et al. Valutazione dell'impatto delle raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC Proteine sull'operatività dei laboratori italiani. *Biochim Clin* 2015;39:585–90.
80. Moss MA. Moving toward harmonized reporting for serum and urine electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:973–9.
81. McCudden CR, Booth RA, Lin DCC, et al. Synoptic reporting for protein electrophoresis and immunofixation. *Clin Biochem* 2018;51:21–8.
82. Tate J, Graziani MS, Willrich M, et al. Report of Survey conducted by IFCC WG Harmonisation of Interpretive Commenting EQA (WG-ICQA) subgroup: Results of an international survey of the reporting of protein electrophoresis and serum free light chains, and quantification of small monoclonal protein. <http://www.ifcc.org/media/477362/results-of-2017-international-survey-on-protein-electrophoresis-2162018.pdf> (ultimo accesso: dicembre 2019)
83. Booth RA, McCudden CR, Balion CM, et al. Candidate recommendations for protein electrophoresis reporting from the Canadian Society of Clinical Chemists Monoclonal Gammopathy Working Group. *Clin Biochem* 2018;51:10–20.
84. Plebani M. Interpretative commenting: A tool for improving the laboratory-clinical interface. *Clin Chim Acta* 2009;404:46–51.
85. Ceriotti F. Standardizzazione e armonizzazione: SIBioC in prima linea. *Biochim Clin* 2015;39:48–55.

APPENDICE

ESEMPIO REFERTO 1:

Elettroforesi e immunofissazione su supporto solido; quantificazione densitometrica su campione delle 24 ore.

RICERCA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES (prima minzione del mattino)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
U-Immunofissazione (metodo: gel d'agarosio, limite di sensibilità 10 mg/L)	Presenza di catene leggere libere monoclonali di tipo κ		
Commento interpretativo:	Ricerca positiva per proteina di Bence Jones κ		
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES (raccolta delle 24 ore)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
Diuresi nelle 24 ore	1,8	L/24 h	
U-Proteine Totali (metodo xx: indicare il metodo impiegato)	123,5	mg/L	0 - 150
U-Proteine Totali/24 ore	222,3	mg/24 h	0 - 150
U-Bence Jones (metodo: scansione densitometrica in elettroforesi su gel d'agarosio)	45,4	mg/L	Assente
U-Bence Jones/24 ore	81,7	mg/24 h	

ESEMPIO REFERTO 2:

Elettroforesi e immunofissazione su supporto solido; quantificazione densitometrica su campione di raccolta prima minzione del mattino.

RICERCA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES (prima minzione del mattino)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
U-Immunofissazione (metodo: gel d'agarosio, limite di sensibilità 10 mg/L)	Presenza di catene leggere libere monoclonali di tipo λ		
Commento interpretativo:	Ricerca positiva per proteina di Bence Jones λ		
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA DI BENICE JONES (campione estemporaneo)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
U-Creatinina	1,8	g/L	
U-Proteine Totali (metodo xx: indicare il metodo impiegato)	123,5	mg/L	0 - 150
Rapporto Proteinuria/Creatinuria (campione della prima minzione giornaliera)	68,6	mg/g creatinina	0 - 300*
U-Bence Jones (metodo: scansione densitometrica in elettroforesi su gel d'agarosio)	45,4	mg/L	Assente
Rapporto Bence Jones/Creatinuria (campione della prima minzione del mattino)	25,2	mg/g creatinina	Assente

* Questi valori di riferimento sono puramente indicativi

Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali

Giuseppe Lippi¹, Laura Sciacovelli², Tommaso Trenti³, Mario Plebani²

¹Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda-Ospedale, Università di Padova

³Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Unità Sanitaria Locale, Modena

ABSTRACT

Kinetics and biological characteristics of humoral response developing after SARS-CoV-2 infection: implications for vaccination.

With the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic outbreak spreading all around the world, an extensive vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is now universally regarded as one of the most effective strategies for counteracting the unremitting spread of this novel coronavirus. Nonetheless, the reasonable need to identify segments of the population in which vaccination shall be prioritized for avoiding a possible shortage of vaccines seems to collide with indications provided by many national and international healthcare organizations, that endorse widespread vaccination irrespective of a positive history of prior symptomatic or asymptomatic SARS-CoV-2 infection. To this end, this document provides an *ad interim* guidance aimed at prioritizing SARS-CoV-2 vaccination in people who are more likely to be infected, re-infected and/or to develop more aggressive COVID-19 illness, essentially based on routine assessment and monitoring of anti-SARS-CoV-2 immune response.

A causa della attualmente inarrestabile diffusione della pandemia da malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), e alla luce di un futuro plausibilmente caratterizzato da diffusione endemica di SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) (1), la vaccinazione contro questo nuovo coronavirus è oggi considerata la strategia più efficace per moderare le drammatiche conseguenze sanitarie, sociali ed economiche di COVID-19 (2).

La recente disponibilità di vari tipi di vaccino, in particolare i due vaccini a RNA, BNT162b2 (3) e mRNA-1273 (4) autorizzati dalla Food and Drug Administration (FDA) e dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) tra la fine del 2020 e l'inizio del 2021, sta aprendo prospettive più ottimistiche nella lotta contro il COVID-19. Nonostante si ritenga necessario vaccinare almeno il 60-70% della popolazione mondiale per ottenere un'immunità di gregge diffusa e duratura (5), la rapidità senza precedenti del successo della ricerca scientifica che ha consentito di progettare, sviluppare e rendere disponibili nuovi vaccini contro SARS-CoV-2 si scontra

con alcune difficoltà oggettive. Questi problemi sono per lo più imputabili alla necessità di fornire una quantità sufficiente di dosi per vaccinare l'intera popolazione mondiale, ma soprattutto le categorie professionali a rischio più alto d'infezione da SARS-CoV-2, come gli operatori sanitari, che sono stati i più colpiti dalla prima ondata dell'epidemia in molti Paesi del mondo (6).

La necessità cogente di identificare uno o più segmenti della popolazione cui dare priorità per la vaccinazione, sembra essere in conflitto con indicazioni fornite da molte organizzazioni sanitarie. I Centers for Disease Control and Prevention degli Stati Uniti (CDC), affermano ad esempio che i vaccini a mRNA sembrano mostrare un adeguato profilo di sicurezza anche in pazienti con evidenza clinica di pregressa infezione da SARS-CoV-2, concludendo così che la vaccinazione possa essere praticata diffusamente, indipendentemente dalla storia clinica positiva per una precedente infezione sintomatica o asintomatica da SARS-CoV-2 (7). Il CDC afferma inoltre che non è necessario eseguire prima della vaccinazione test

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10, 37134 Verona, Tel 0039-045-8122970, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 11.01.2021

Revisionato: 11.01.2021

Accettato: 11.01.2021

Pubblicato on-line: 11.01.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.001

molecolari volti a diagnosticare un'infezione acuta da SARS-CoV-2, nè tantomeno esami sierologici per caratterizzare l'eventuale sieropositività al virus. Questa generica indicazione è stata avallata da molti governi e autorità sanitarie in tutto il mondo, sicché le campagne di vaccinazione sono oggi svolte nella massima parte dei casi senza verificare la possibile presenza (e l'eventuale titolo) di anticorpi anti-SARS-CoV-2. Questo assunto si basa sulle premesse che l'immunità naturale contro il virus potrebbe non essere durevole e protettiva, e che questo tipo di vaccinazione non dovrebbe associarsi a rischi per pazienti con positività per anticorpi anti-SARS-CoV-2 (8). Quest'ultima affermazione è particolarmente discutibile, poiché i pazienti con precedente infezione da COVID-19 sono stati esclusi dagli studi di fase III sui vaccini ad RNA, e quindi il rischio di sviluppare effetti avversi in questa popolazione di pazienti non può essere inequivocabilmente escluso.

Malgrado i dubbi relativi a durata e protezione dell'immunità umorale contro SARS-CoV-2 rimangano per lo più irrisolti (9), stanno emergendo evidenze biologiche e cliniche che mettono in dubbio l'efficacia e l'efficienza di strategie vaccinali diffuse che si rivolgano quindi anche a pazienti recentemente "guariti" da un'infezione da SARS-CoV-2 completamente asintomatica, lievemente sintomatica o anche gravemente sintomatica. Un recente articolo, pubblicato da Dan et al. sulla prestigiosa rivista *Science* (10), ha dimostrato come la memoria immunitaria circolante contro SARS-CoV-2 possa durare fino a 6 mesi in pazienti con pregressa infezione da SARS-CoV-2. In particolare, il titolo delle immunoglobuline (Ig) G dirette contro la proteina spike di SARS-CoV-2 è apparso relativamente stabile nel tempo [emivita di 140 giorni; intervallo di confidenza al 95% (95% CI), 20-240 giorni], mentre i linfociti B con memoria specifica per la proteina spike di SARS-CoV-2 sembrano persistere a distanza di 6 mesi dopo un'infezione da SARS-CoV-2 in quantità addirittura più abbondante rispetto al periodo precedente. È altresì interessante l'osservazione di come il 90% dei pazienti mantenga sieropositività per IgG contro la proteina spike di SARS-CoV-2 a 6-8 mesi dopo l'infezione. La determinazione delle IgA contro la proteina spike di SARS-CoV-2, una classe di anticorpi espressi alla superficie delle mucose e quindi almeno teoricamente in grado di conferire una protezione efficace contro la reinfezione (11), ha rivelato un'emivita ancora più lunga rispetto alle IgG (210 giorni; 95% CI 126-703 giorni).

Complessivamente, questi dati sono in linea con i risultati pubblicati in precedenza, che suggeriscono come l'immunità umorale contro SARS-CoV-2 (12), così come quella dei linfociti B di memoria (13), durerebbe non meno di 4-6 mesi dopo un'infezione acuta, soprattutto in pazienti che abbiano sviluppato una forma particolarmente aggressiva della malattia. Per quanto invece concerne la questione se questa immunità sia protettiva contro la reinfezione o la trasmissione del virus, i risultati di uno studio recente condotto da Kim et

al. hanno generato importanti elementi degni di attenzione (14). Gli autori hanno studiato una coorte di furetti, inizialmente infettati con SARS-CoV-2 per potenziare la produzione di anticorpi neutralizzanti. In un secondo momento, gli animali sono stati suddivisi in cinque gruppi sulla base del titolo di anticorpi neutralizzanti, e sono stati sottoposti ad una seconda infezione con un ceppo eterologo di SARS-CoV-2. È importante sottolineare come i furetti con titolo anticorpale compreso tra moderato ed elevato (da 1:20 a 1:160) non solo erano protetti dalla reinfezione, ma si sono anche rivelati incapaci di trasmettere il virus ad altri animali non infetti. Questi risultati supportano i risultati emersi dagli studi sui vaccini BNT162b2 (3) e mRNA-1273 (4), secondo cui lo sviluppo di un'immunità anti-SARS-CoV-2 ridurrebbe di quasi il 95% il rischio di ammalarsi di COVID-19, assieme ad un'altrettanto efficiente protezione contro il rischio di infezione da SARS-CoV-2. Risultati molto simili sono anche emersi in uno studio di siero-prevalenza che ha coinvolto oltre 12500 operatori sanitari (15), e che ha potuto dimostrare come una precedente infezione da SARS-CoV-2 possa generare una risposta immunitaria umorale tale da ridurre di quasi 10 volte il rischio di risultati positivi ad un secondo test molecolare per SARS-CoV-2 (tasso di incidenza aggiustato, 0,11; 95% CI 0,03-0,44).

È ormai acclarato che produzione, diffusione e somministrazione di vaccini contro SARS-CoV-2 rappresentino sfide epocali, e tali rimarranno per molto tempo ancora (2). Tali problematiche si teme possano ritardare l'auspicata generazione di una solida e duratura immunità di gregge, efficace per contrastare sia la circolazione del virus che l'infezione di soggetti più fragili che presentano un maggior rischio di sviluppare forme gravi, anche letali, della malattia. Inoltre, sebbene il costo dei vaccini diminuirà gradualmente nel tempo in parallelo a sviluppo, approvazione e commercializzazione di nuove formulazioni, la spesa prevista per vaccinare miliardi di persone in tutto il mondo è colossale.

In questo enigmatico scenario, è nostra convinzione che la vaccinazione contro SARS-CoV-2 debba seguire delle priorità tali per cui i soggetti che hanno meno probabilità di essere infettati, reinfezati e/o di sviluppare una forma più aggressiva di COVID-19 debbano essere vaccinati solo dopo che i segmenti più fragili e vulnerabili della popolazione abbiano acquisito un grado sufficiente di immunità protettiva. Questa considerazione pone le premesse per alcune opzioni (non mutuamente esclusive), che ci portano a formulare alcune raccomandazioni *ad interim*:

- il titolo degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 [anti-spike, preferibilmente contro il receptor binding domain (RBD) ed eventualmente anche le IgA] dovrebbe essere determinato prima della vaccinazione, cosicché possa essere data priorità per la somministrazione del vaccino ai soggetti sieronegativi. A questo proposito si suggerisce l'utilizzo di saggi immunometrici che abbiano una ben dimostrata correlazione con gli

- anticorpi neutralizzanti anti-SARS-CoV-2 (16);
- qualora la titolazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 sia impossibile o non fattibile, la vaccinazione contro SARS-CoV-2 di pazienti con diagnosi molecolare di infezione recente (<3 mesi) dovrebbe essere posticipata, almeno fino a quando categorie a rischio più elevato di soggetti sieronegativi abbiano completato il ciclo vaccinale o il virus abbia accumulato mutazioni tali da far supporre che la protezione naturale acquisita possa essere inefficace;
 - gli immunodosaggi quantitativi sono preferibili a quelli che generano solo risultati semiquantitativi o qualitativi (17), così come le tecniche completamente automatizzate sono consigliabili per supportare grandi volumi di esami;
 - il titolo degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 (anti-spike, preferibilmente contro il RBD ed eventualmente anche le IgA) dovrebbe essere monitorato per almeno 6-8 mesi, preferibilmente a partire da 1 a 2 settimane dopo la somministrazione dell'ultima dose di vaccino (quando sia prevista più di una dose) utilizzando sempre lo stesso metodo. Ciò consentirebbe di identificare tempestivamente l'assenza di sieropositività o la sieronegativizzazione, consentendo così di guidare il processo decisionale clinico verso una possibile rivaccinazione contro SARS-CoV-2 o somministrazione di nuovi agenti terapeutici, come gli anticorpi monoclonali anti-SARS-CoV-2;
 - la determinazione degli anticorpi prima della somministrazione del vaccino ed il monitoraggio a tempi successivi sono assolutamente necessari per categorie di pazienti immunodepressi, in trattamento farmacologico con farmaci immunosoppressori ed immunoregolatori e nei pazienti con patologie di carattere oncologico.

Si ritiene infine che sia necessario chiarire altri aspetti, alla luce del disorientamento emerso, in merito a competenza e responsabilità per:

- l'identificazione del tipo di esame più appropriato da utilizzare sulla base della prevalenza della malattia, delle caratteristiche della popolazione e degli algoritmi diagnostici;
- la valutazione/validazione degli esami molecolari, antigenici e/o sierologici;
- la tracciabilità ed il rilascio dei risultati.

Le prestazioni (analitiche e diagnostiche) di ogni specifico esame di laboratorio dovrebbero sempre essere validate e/o verificate da professionisti di Medicina di Laboratorio in collaborazione con le istituzioni sanitarie e le aziende del diagnostico, poiché solo gli esperti di Medicina di Laboratorio possiedono capacità e competenze idonee per l'utilizzo degli esami conforme alle loro prestazioni. Questi aspetti appaiono ancor più rilevanti nel corso della pandemia, alla luce del fatto che organismi di regolamentazione quali FDA hanno rilasciato una "Emergency Use Authorization" per vari sistemi diagnostici e reagenti da utilizzare nel contesto del COVID-19. I professionisti di Medicina di Laboratorio dovrebbero inoltre essere coinvolti nella

selezione degli esami più idonei secondo i criteri sopra descritti, nonché nell'identificazione di algoritmi per la diagnostica SARS-CoV-2 (ad esempio, per la ripetizione dell'esame o per protocolli di analisi ortogonale, con test "a cascata"). Si ravvisa infine l'opportunità di un monitoraggio della risposta cellulare al vaccino, ove essa sia indicata e fattibile.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Shaman J, Galanti M. Will SARS-CoV-2 become endemic? *Science* 2020;370:527-9.
2. Rubin EJ, Longo DL. SARS-CoV-2 Vaccination - An ounce (actually, much less) of prevention. *N Engl J Med* 2020;383:2677-8.
3. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020;383:2603-15.
4. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* 2020 doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
5. Omer SB, Yildirim I, Forman HP. Herd immunity and implications for SARS-CoV-2 control. *JAMA* 2020;324:2095-6.
6. Plebani M, Padoan A, Fedeli U, et al. SARS-CoV-2 serosurvey in health care workers of the Veneto Region. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2107-11.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Interim clinical considerations for use of mRNA COVID-19 vaccines currently authorized in the United States. https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/info-by-product/clinical-considerations.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fvaccines%2F%2F%2Finfo-by-product%2Fpfizer%2Fclinical-considerations.html. Ultimo accesso: gennaio 2021.
8. European Commission. Questions and Answers: COVID-19 vaccination in the EU. at: https://www.taiwanembassy.org/uploads/sites/124/2020/12/Questions_and_Answers_COVID-19_vaccination_in_the_EU.pdf. Ultimo accesso: gennaio 2021.
9. Alwan NA, Burgess RA, Ashworth S, et al. Scientific consensus on the COVID-19 pandemic: we need to act now. *Lancet* 2020;396:e71-2.
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021 doi: 10.1126/science.abf4063.
11. Lippi G, Mattiuzzi C. Clinical value anti-SARS-COV-2 serum IgA titration in patients with COVID-19. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.26539.
12. Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, et al. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* 2021;12:63.
13. Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol*. 2020 doi: 10.1126/sciimmunol.abf8891.
14. Kim YI, Kim SM, Park SJ, et al. Critical role of neutralizing antibody for SARS-CoV-2 reinfection and

- transmission. *Emerg Microbes Infect* 2021 doi: 10.1080/22221751.2021.1872352.
15. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, et al. *N Engl J Med* 2020 doi: 10.1056/NEJMoa2034545.
 16. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M, et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine*. 2020;62:103101.
 17. Lippi G, Plebani M. SARS-CoV-2 antibodies titration: a reappraisal. *Ann Transl Med* 2020;8:1032.

Raccomandazioni ad interim di SIBioC per l'analisi sierologica dell'infezione da SARS-CoV-2

Giuseppe Lippi¹, Sergio Bernardini², Marcello Ciaccio³, Tommaso Trenti⁴, Laura Sciacovelli⁵, Mario Plebani⁵, per il Gruppo Operativo SIBioC su COVID-19

¹Sezione di Biochimica Clinica e UOC Laboratorio Analisi, Università degli Studi di Verona e Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Tor Vergata-Roma

³Istituto di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare Clinica e Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo e Dipartimento e UOC di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "P. Giaccone", Palermo

⁴Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ausl e Azienda Ospedaliera Universitaria di Modena

⁵Dipartimento DIDAS Servizi di Diagnostica Integrata, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

ABSTRACT

Ad interim SIBioC recommendations for serological assessment of SARS-CoV-2 infection.

The recent pandemic outbreak caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and associated with the pathology called COVID-19 (coronavirus disease 2019), has now become one of the most strenuous health care challenges since the emergence of the three pandemics caused by influenza viruses during the past century. Throughout the clinical decision-making of COVID-19, laboratory tests are essential for supporting the screening, diagnosis, prognostication and therapeutic monitoring of this severe infectious disease. Serological testing, that reflects the humoral immune response developing after interaction between the host and the virus (or its components), enables to garner a vast array of clinical information which can be especially used in seroprevalence or seroconversion studies. To this end, the Task Force on COVID-19 of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) has endorsed a series of technical, practical and clinical ad interim recommendations, aimed at facilitating and optimizing the introduction, clinical usage and governance of SARS-CoV-2 serological immunoassays in routine practice.

GENERALITÀ SULLA PANDEMIA DA SARS-COV-2

La recente pandemia, causata dal coronavirus denominato SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) ed associata alla patologia denominata COVID-19 (coronavirus disease 2019), sta rappresentando una delle sfide sanitarie più complesse dai tempi delle tre ultime tragiche pandemie influenzali causate dai virus H1N1 ("Spagnola", nel 1918-19), H2N2 ("Asiatica", nel 1957-58) e H3N2 ("Hong Kong", nel 1968) (1). Le peculiari caratteristiche biologiche di questo nuovo coronavirus, congiuntamente ad elevata contagiosità (anche in fase presintomatica e asintomatica) e minore mortalità (circa 2%) al confronto con le due precedenti epidemie da coronavirus definite

SARS (severe acute respiratory syndrome; mortalità prossima al 10%) nel 2002-3 e MERS (Middle-East respiratory syndrome; mortalità di poco superiore al 35%) nel 2012, ne favoriscono una maggiore trasmissibilità ed un più complesso contenimento (2,3). Le diverse strategie adottate fino ad oggi per contenere il dilagare della pandemia (distanziamento sociale, utilizzo delle maschere facciali, igiene delle mani, limitazioni della libertà individuale di movimento e socializzazione) hanno consentito di limitare solo parzialmente la diffusione della pandemia, cosicché la vaccinazione è universalmente ritenuta l'opzione più efficace per governare la transizione dallo status pandemico a quello endemico o, auspicabilmente, alla completa eradicazione del virus (4,5). In tutto l'ambito decisionale clinico, gli esami di

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona, Piazzale L.A. Scuro, 10, 37134 Verona, Tel 0039-045-8122970, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 21.01.2021

Revisionato: 21.02.2021

Accettato: 21.01.2021

Pubblicato on-line: 22.01.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.002

laboratorio rivestono un'importanza essenziale come supporto allo screening, alla diagnosi, alla valutazione prognostica e al monitoraggio terapeutico (6), e COVID-19 rappresenta un paradigma di questo concetto (7-10). L'analisi sierologica, in particolare, riflettendo convenzionalmente un contatto tra sistema immunitario dell'ospite e patogeno, consente di dedurre un ampio spettro di informazioni cliniche, come descritto in dettaglio nel paragrafo seguente.

LA RISPOSTA ANTICORPALE CONTRO SARS-COV-2

Analogamente ad altre malattie infettive, la reazione dell'organismo al contatto (naturale, quindi conseguente ad un'infezione, o artificiale per effetto di un vaccino) con SARS-CoV-2 o sue componenti genera due tipi di risposta immunitaria, genericamente classificati come cellulare ed umorale. La risposta immunitaria cellulomediata non è oggetto di questo documento, e non sarà quindi analizzata in dettaglio, anche se è sempre più evidente la sua importanza sia dal punto di vista fisiopatologico che per ricadute di diagnostica clinica. La risposta umorale, si basa invece sulla generazione di anticorpi diretti contro determinanti antigenici del patogeno, così contribuendo a ridurre la capacità di legame ai recettori dell'ospite (neutralizzazione) e/o creare immunocomplessi con il virus, che possano poi essere catturati ed eliminati con meccanismi mediati dalle cellule del sistema immunitario. In linea generale, la reazione immunitaria ai patogeni respiratori di natura virale si caratterizza per la comparsa di immunoglobuline (Ig) di classe IgM (pentameriche, rapide e poco specifiche), IgG (monomeriche, solitamente più tardive ma più specifiche) ed IgA (presenti in forma monomerica nel circolo ematico e, in forma dimerica, alla superficie delle mucose), mentre la generazione di immunoglobuline di classe IgE e IgD appare complessivamente meno rilevante dal punto di vista biologico e/o clinico (11).

Al contrario di una classica infezione virale, la risposta umorale a seguito di un'infezione da SARS-CoV-2 è caratterizzata da entità e cinetica che assumono contorni paradigmatici, virtualmente esclusivi. Nella fattispecie, esistono solide evidenze scientifiche secondo cui la generazione complessiva (dall'esordio dei sintomi fino ad oltre 1 mese dall'infezione) di anticorpi specifici di classe IgM sia incostante in pazienti con infezione da SARS-CoV-2, presente in circa il 50-70% dei casi, come sintetizzato in una meta-analisi del Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group (12). Questi dati sono del tutto sovrapponibili a quelli riportati da una seconda e più recente meta-analisi (13). Al contrario delle IgM, la risposta delle IgG specifiche anti-SARS-CoV-2 appare più frequente (presente fino al 100% dei casi), più sostenuta (il livello anticorpale è generalmente più elevato di quello delle IgM), non meno precoce (compaiono pressoché contemporaneamente alle IgM) e duratura (persiste per mesi, mentre quello delle IgM tende a declinare considerevolmente dopo 30-

45 giorni dalla comparsa dei sintomi d'infezione) (14,15). Un analogo comportamento è stato descritto per le IgA sieriche le quali, oltre ad avere un valore circolante che correla sommariamente con quello secretivo (16,17), hanno prevalenza e cinetica sovrapponibili a quelle delle IgG, ed anche il loro valore sembra correlare con la severità clinica della patologia (18). In linea generale, la siero-positivizzazione dipende strettamente dal tempo intercorso dai sintomi. Nella meta-analisi pubblicata dal Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group, la sensibilità delle diverse classi di Ig aumenta progressivamente nel corso del tempo, così come illustrato in Figura 1 (12); come detto, tali dati sono del tutto sovrapponibili a quelli riportati da una seconda e più recente meta-analisi (13).

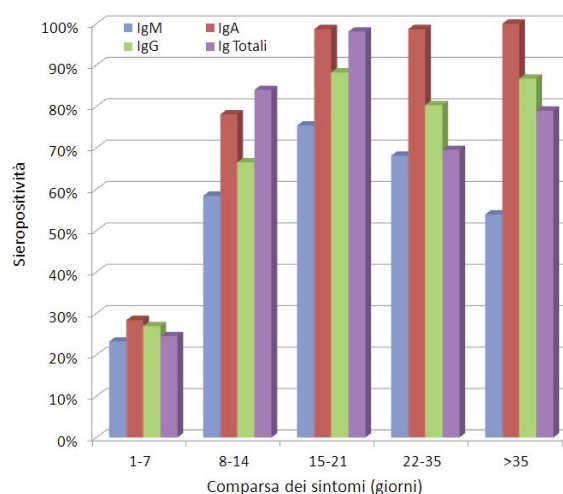


Figura 1. Cinetica di sieropositività delle differenti classi di immunoglobuline (Ig) in funzione del tempo intercorso dalla comparsa dei sintomi di COVID-19 (coronavirus disease 2019) (da ref 12, modificata).

E' altresì interessante notare come la frequenza di comparsa delle Ig specifiche sembra associarsi alla sintomatologia clinica. Nello specifico, in soggetti con infezione prevalentemente asintomatica da SARS-CoV-2 la comparsa di anticorpi specifici è considerevolmente inferiore (19), indipendentemente dal metodo utilizzato o dalla classe di anticorpi analizzata (20), compresi gli anticorpi neutralizzanti (21). Contestuale a questa valutazione è l'osservazione che la severità clinica di COVID-19 sembra associarsi frequentemente a livelli elevati di tutte le classi anticorpali, come confermato da varie pubblicazioni in materia (22-24).

L'efficacia clinica nel prevenire l'infezione, la reinfezione e la potenziale trasmissione del virus rappresenta l'aspetto essenziale della immunità umorale contro SARS-CoV-2 (25). Malgrado non esistano ancora prove solide e definitive, alcuni studi recenti suggeriscono che la comparsa di immunità naturale (infezione) o vaccinale, potrebbe conferire una buona

protezione contro il contagio (attivo o passivo) con stipiti virali che non abbiano subito eccessive mutazioni genetiche rispetto allo stipite originario, e che abbiano pertanto una struttura molecolare sufficientemente simile a quella contro cui il soggetto si è immunizzato (5,26-28). La durata di questa copertura anticorpale è ancora oggetto di studio. Alla luce delle evidenze preliminari disponibili al momento di redigere questo documento, si ritiene che essa possa durare non meno di 3-6 mesi, e sia probabilmente maggiore in soggetti con livello anticorpale di base più elevato, così come si osserva solitamente a seguito di un'infezione clinicamente più severa o di una risposta vaccinale più efficiente (29-32). A causa della relativamente recente insorgenza di COVID-19, sono ancora vaghe le informazioni relative ad efficienza e durata della memoria immunitaria (comprendente la selezione clonale dei linfociti B) e dell'immunità cellulare, per le quali è legittimo supporre che le conoscenze scientifiche evolvano nel corso delle prossime settimane o dei prossimi mesi, ma certamente lo studio dell'immunità cellulare darà risposte importanti nella comprensione delle diverse espressioni fenotipiche della malattia.

Sarà altresì necessario verificare costantemente se e come gli immunodosaggi attualmente in uso siano in grado di riconoscere tutti gli anticorpi anti-SARS-CoV-2 generati in pazienti infettati da nuove varianti del virus (33), soprattutto quelle recanti mutazioni che alterano significativamente struttura e immunogenicità di proteina S e/o receptor binding domain (RBD; mutazione E484K, ad esempio) (Figura 2) (29).

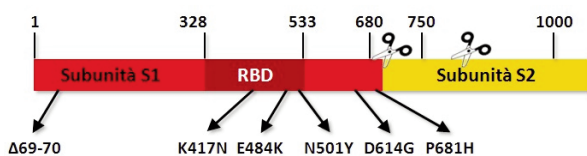


Figura 2.

Sequenza della proteina spike (S) di SARS-CoV-2 (severe acute respiratory disease coronavirus 2), comprendente il receptor binding domain (RBD), con indicazione delle mutazioni più recenti in grado di modificare struttura, antigenicità e/o funzione della proteina.

PRESUPPOSTI ANALITICI DEGLI IMMUNODOSAGGI

Per far fronte all'urgente e consistente domanda di test per il rilevamento di anticorpi specifici anti-SARS-CoV-2, l'industria del diagnostico ha sviluppato ed introdotto in commercio un considerevole numero di metodi immunometrici (34,35), caratterizzati da spiccata eterogeneità per quanto concerne:

- matrice biologica (sangue venoso o capillare, saliva, ecc.);
- classe anticorpale rilevata (anticorpi totali, IgM, IgG, IgA);

- determinante antigenico di SARS-CoV-2 riconosciuto dagli anticorpi (proteina N o S, RBD)
- tecnica analitica di rilevamento (CGIA, CLIA, ELISA, LFA, immunocromatografia, ecc.) (Figura 3);
- sensibilità analitica (limite di rilevamento, sensibilità funzionale);
- prestazioni diagnostiche (sensibilità, specificità, concordanza con test di neutralizzazione);
- disponibilità per diagnostica decentrata, possibilità di automazione;
- espressione del risultato (qualitativo, semi-quantitativo quantitativo);
- tipologia di validazione e/o certificazione.

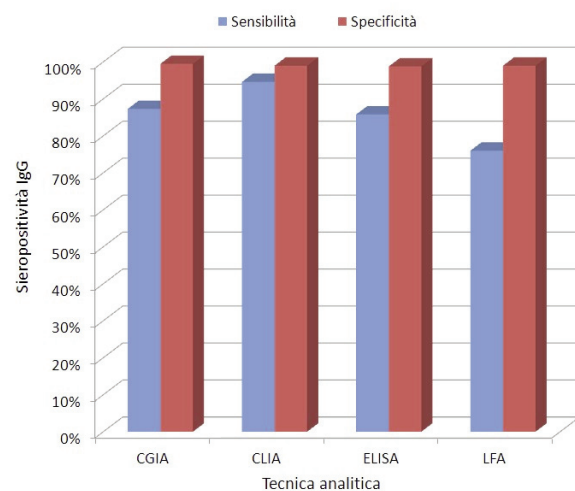


Figura 3.

Sensibilità e specificità rispetto all'analisi molecolare su tampone nasofaringeo delle differenti tecniche diagnostiche per determinazione delle immunoglobuline di classe G (IgG) contro SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) (da ref 12, modificata).

CGIA, colloidal gold immunoassay; CLIA, chemiluminescence immunoassay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LFA, lateral flow assay.

Come evidenziato da una recente indagine condotta dal College of American Pathologists (CAP), su oltre 1100 laboratori clinici statunitensi, la problematica relativa alla tuttora insufficiente standardizzazione dei metodi si riflette in una poco soddisfacente confrontabilità dei risultati, anche quando essi siano espressi solo qualitativamente (36). In particolare, si è evidenziato come a fronte di una concordanza complessiva di poco superiore al 90% tra oltre 15 differenti metodi commerciali, la sensibilità diagnostica in un siero con livello di IgG anti-SARS-CoV-2 di poco superiore al valore soglia variava da 0 a 100%. Peggior concordanza è stata osservata nel confronto tra immunodosaggi per il rilevamento delle IgM ed IgA specifiche anti-SARS-CoV-2.

La concordanza che gli immunodosaggi oggi disponibili in commercio, e che utilizzano come antigene

la proteina Spike e/o il RBD, presentano nei confronti dei test di neutralizzazione virale, è un aspetto sostanziale. Riportata in molti articoli recenti, la sensibilità delle IgG specifiche anti-SARS-CoV-2 per predire l'attività di neutralizzazione appare nella massima parte dei casi uguale o superiore a 80% (titolo neutralizzante 1:20), con accuratezza diagnostica (area sotto la curva; AUC) compresa tra 0,74 e 0,99 (37-41). L'utilizzo di alcuni di questi immunodosaggi, nello specifico quelli le cui prestazioni analitiche siano state idoneamente verificate, può quindi rappresentare un valido surrogato (ad esempio come tecnica di screening) dei test di neutralizzazione, la cui disponibilità su larga scala ed in tempi rapidi permane tuttora limitata, anche per le modalità operative che impongono adozione di livelli elevati di biosicurezza.

Oltre che nei siti istituzionali della Commissione Europea (42) e della Food and Drug Administration (43), un elenco aggiornato delle diverse tecniche immunometriche e delle rispettive caratteristiche è disponibile in alcuni siti, quali FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) (44) e COVID-19 Evidence Commons (45). Senza voler entrare nel merito specifico dei vantaggi e svantaggi legati alle diverse caratteristiche degli immunodosaggi, il Gruppo Operativo su COVID-19 di SIBioC, ritiene quindi opportuno formulare le sottoelencate raccomandazioni (*ad interim*) relative all'introduzione, utilizzo clinico e governance delle tecniche immunometriche per il rilevamento e/o la quantificazione di anticorpi anti-SARS-CoV-2.

RACCOMANDAZIONI (AD INTERIM)

Definizione operativa

1. Si definisce "analisi sierologica" per SARS-CoV-2 la valutazione della risposta immunitaria umorale basata sulla ricerca di anticorpi specifici generati dall'organismo contro il virus in risposta ad un'infezione (asintomatica o sintomatica) da SARS-CoV-2, o ad un vaccino anti-COVID-19. Può fare parte di questo ambito diagnostico anche il monitoraggio di anticorpi specifici anti-SARS-CoV-2 somministrati a scopo terapeutico (plasma iperimmune, terapie con anticorpi monoclonali).

Uso clinico degli esami sierologici

1. L'analisi sierologica di norma non è utilizzata per la diagnosi d'infezione da SARS-CoV-2. Può affiancare l'analisi molecolare solo in circostanze specifiche (ripetuta negatività agli esami molecolari contestualmente a elevato sospetto clinico).
2. L'analisi sierologica è quindi essenzialmente rivolta a:
 - 2.1 monitoraggio clinico dell'infezione da SARS-CoV-2 (il livello anticorpale correla solitamente con la gravità clinica) (46);
 - 2.2 stima della prevalenza dell'infezione in un deter-

minato contesto geografico e/o di popolazione (operatori sanitari, pazienti oncologici, ospiti di residenze sanitarie assistenziali, e così via) nei 3-6 mesi precedenti al campionamento (47,48);

- 2.3 diagnosi retrospettiva in pazienti asintomatici o paucisintomatici, che non abbiano richiesto visite ed esami al momento dell'infezione (49);
- 2.4 accertamento di sieronegatività pre-vaccinale (25);
- 2.5 accertamento e monitoraggio della sieropositivizzazione post-infettiva e post-vaccinale (25);
- 2.6 monitoraggio di anticorpi anti-SARS-CoV-2 somministrati a scopo terapeutico.

Caratteristiche analitiche

Target antigenico

1. L'utilizzo di immunodosaggi diretti contro l'antigene N (proteina del nucleocapside) o S (proteina spike) è equivalente nell'ambito degli studi di sieroprevalenza (sensibilità diagnostica di 94,4% per IgG anti-proteina S *versus* 93,5% per IgG anti-proteina N) (35), anche se è dimostrata una maggior permanenza di positività utilizzando immunodosaggi basati sulla proteina S o, più precisamente, su RBD.
2. La definizione e/o il monitoraggio del potenziale neutralizzante degli anticorpi generati in risposta ad infezione o vaccino deve utilizzare immunodosaggi basati sull'antigene S (proteina spike, trimerica) e/o RBD.
3. Il target antigenico contenuto nell'immunodosaggio deve essere sistematicamente monitorato ed eventualmente ridefinito dai produttori in funzione dell'insorgenza di nuove varianti recanti variazioni del target della risposta antigenica. Deve quindi anche essere considerata la possibilità che i test correntemente in uso che rilevano anticorpi contro la proteina Spike e/o il RBD di SARS-CoV-2 possano generare risultati falsamente negativi in soggetti infettati da nuove varianti antigeniche (Figura 2) (50,51).

Classe di immunoglobuline

1. Gli studi di sieroprevalenza devono basarsi su immunodosaggi che valutano le immunoglobuline di classe IgG, o su metodi che prevedano la determinazione degli anticorpi "totali".
2. L'utilizzo di immunodosaggi che valutano le immunoglobuline di classe IgA può essere utile in aggiunta a quelli che valutano le IgG, poiché il loro livello sierico/plasmatico dimostra discreta correlazione con quelle secretive.
3. L'utilizzo di immunodosaggi che valutano le immunoglobuline di classe IgM, malgrado esse partecipino comunque all'attività neutralizzante, non è consigliato sia a scopo diagnostico e/o per gli studi di sieroprevalenza.

Caratteristiche dell'immunodosaggio

1. Gli immunodosaggi che forniscono risultati quantitativi sono generalmente preferibili a quelli semi-quantitativi o qualitativi.
2. Il siero-monitoraggio periodico deve essere sempre eseguito utilizzando lo stesso immunodosaggio, sulla medesima piattaforma analitica.
3. Qualora sia necessaria la determinazione di un elevato numero di campioni, si suggerisce l'utilizzo di tecniche automatizzate su piattaforme ad elevata produttività.

Validazione analitica e clinica

1. Tutti gli immunodosaggi volti alla determinazione di anticorpi anti-SARS-CoV-2 devono essere oggetto di validazione (nel caso non sia stata validata allo scopo d'uso dal produttore, in accordo a protocolli riconosciuti a livello internazionale) o verificata (se già validata dal produttore) in accordo a procedure conformi ai requisiti della norma ISO 15189:2012 dai Professionisti di Medicina di Laboratorio. I protocolli di validazione e verifica devono fornire evidenza oggettiva dell'adeguatezza delle prestazioni analitiche e diagnostiche ottenute, prima della loro introduzione in commercio. Si consiglia in particolare di valutare:
 - 1.1 Sensibilità diagnostica: calcolata su un numero sufficiente di pazienti con diagnosi molecolare di infezione da SARS-CoV-2 (non meno di 200 campioni, equamente distribuiti in funzione della comparsa dei sintomi, come descritto in seguito), ed espressa in funzione del periodo intercorso dalla comparsa dei sintomi. In aggiunta alla sensibilità complessiva, si suggerisce di riportare quindi la sensibilità diagnostica secondo questa tempistica: 0-7 giorni (50 campioni), 8-14 giorni (50 campioni), 15-30 giorni (50 campioni), 31-180 giorni (50 campioni).
 - 1.2 Specificità diagnostica: calcolata su un numero sufficiente di soggetti di riferimento ("sani") (non meno di 200), arruolati in periodo pre-pandemico (almeno antecedenti a Settembre 2019 o già identificati come "negativi" per anticorpi anti-SARS-CoV-2 utilizzando procedure analitiche validate) e campioni di pazienti con possibili interferenze (malattie autoimmuni, altre infezioni da coronavirus diversi).
 - 1.3 Definizione dell'accuratezza diagnostica: espressa come "accordo" (agreement, kappa statistics) e/o AUC della curva ROC (Receiver Operating Characteristics), utilizzando i risultati dei campioni di cui ai precedenti due punti.
 - 1.4 Valore soglia (per metodi quantitativi): il limite decisionale indicato dal produttore deve essere confermato localmente sulla base del punto precedente (sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi della curva ROC).
 - 1.5 Imprecisione (per metodi quantitativi): l'imprecisione intra- ed inter-serie espressa dal produttore

deve essere verificata localmente su almeno due livelli (uno negativo ed uno positivo), utilizzando i protocolli in uso per l'accreditamento delle procedure analitiche di laboratorio secondo i requisiti della norma International Organization for Standardization (ISO) 15189:2012 e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

- 1.6 Linearità (per metodi quantitativi): la linearità documentata dal produttore deve essere verificata localmente nell'ambito dei livelli clinicamente rilevanti di immunoglobuline specifiche anti-SARS-CoV-2, utilizzando i protocolli in uso per l'accreditamento delle procedure analitiche di laboratorio secondo i requisiti della norma ISO 15189:2012.

Introduzione nella pratica clinica

1. L'introduzione nella pratica clinica, per ogni possibile utilizzo, deve essere concordata tra Professionisti di Medicina di Laboratorio, Clinici e componenti della Direzione Sanitaria/Medica, basandosi su algoritmi validati che prevedano l'eventuale attivazione di esami "a cascata" (ad esempio determinazione quantitativa a seguito di quella qualitativa, valutazione del potenziale neutralizzante, analisi molecolare, sequenziamento) (52).
2. L'esecuzione dell'esame su matrici alternative a quelle convenzionalmente indicate dal produttore (ad esempio saliva, sangue capillare, altri liquidi biologici) deve essere accuratamente validato prima dell'utilizzo (53).
3. Nei protocolli di siero-monitoraggio vaccinale, la determinazione anticorpale dovrebbe seguire una tempistica ben definita, ad esempio (25):
 - 3.1 nel periodo immediatamente antecedente (da 1 a 7 giorni) la somministrazione della prima dose del ciclo vaccinale;
 - 3.2 da 1 a 2 settimane dopo la somministrazione dell'ultima dose del ciclo vaccinale (se multiple);
 - 3.3 ogni 3 mesi successivi alla somministrazione dell'ultima dose del ciclo vaccinale (se multiple), fino a completa negativizzazione sierologica.
4. Qualora siano utilizzate tecniche diagnostiche rapide (manuali o "point of care"), è necessario stilare delle procedure operative per il loro utilizzo, supervisionate da personale esperto di Medicina di Laboratorio.

Controllo di qualità

1. Gli immunodosaggi devono essere soggetti a protocolli di controllo di qualità interno (CQI) e verifica esterna di qualità (VEQ), per monitorare costantemente le prestazioni (54), gestiti in conformità ai requisiti della norma ISO 15189:2012.
 - 1.1 CQI: in aggiunta al controllo interno, si consiglia di utilizzare un materiale di terza parte (diverso da quello del produttore) e/o campioni di siero o plasma di pazienti idoneamente conservati (ad esempio congelati a -70°C);
 - 1.2 VEQ: si consiglia di aderire a programmi di VEQ

gestiti da provider di terza parte di comprovata competenza, che includano materiali di produttori di comprovata esperienza e/o qualità in ambito di VEQ.

Espressione dei risultati

1. Il fruitore del risultato dell'esame (paziente, genitore nel caso di minori, clinico, altro operatore sanitario) deve essere informato e conoscere il significato clinico dell'esame e le possibili criticità legate alla generazione di falsi positivi e/o negativi in relazione alla tecnica utilizzata.
2. I risultati devono essere espressi sempre evidenziando la "negatività" o "positività" sierologica, riportando auspicabilmente anche il livello anticorpale (se metodo quantitativo e con unità rapportabili a SI).
3. I risultati devono essere introdotti (preferibilmente in automatico) nel sistema informatico del laboratorio e/o della struttura sanitaria, garantendone accessibilità mediante fascicolo sanitario elettronico.
4. Il referto deve contenere indicazioni chiare su:
 - 4.1 metodo utilizzato (FIA, CLIA, ELISA, cromatografico, etc.);
 - 4.2 classe anticorpale (anticorpi totali, IgG, IgM, IgA);
 - 4.3 target antigenico (proteina N o S, RBD);
 - 4.4 livello (valore sierico o plasmatico) anticorpale (se metodo quantitativo);
 - 4.5 unità di misura (se metodo quantitativo);
 - 4.6 valore soglia di positività (se metodo quantitativo).
5. In assenza di una sufficiente standardizzazione, i risultati generati da immunodosaggi differenti non devono essere comparati, né utilizzati in alternativa uno all'altro nel monitoraggio a medio o lungo termine della sieroconversione.
6. Qualora siano utilizzate tecniche diagnostiche rapide (manuali o "point of care"), l'utilizzatore deve essere adeguatamente formato all'esecuzione dell'esame, alla verifica di qualità, e all'interpretazione analitica e clinica del risultato, soprattutto se il metodo è qualitativo (comparsa della banda di controllo, intensità della banda, ecc.), prevedendo consulenza da parte dei Professionisti di Medicina di Laboratorio.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

Tabella sinottica delle raccomandazioni *ad interim*

Definizione operativa di analisi sierologica	Valutazione della risposta immunitaria umorale tramite ricerca di anticorpi (ab) specifici antivirali in risposta ad un'infezione da SARS-CoV-2, o ad un vaccino anti-COVID-19 o per monitoraggio terapeutico (plasma iperimmune, ab monoclonali)
Uso clinico	<ul style="list-style-type: none"> - monitoraggio clinico dell'infezione - stima di prevalenza in segmenti specifici di popolazione - diagnosi retrospettiva in pazienti a- o pauci-sintomatici - accertamento di siero-negatività pre-vaccinale - monitoraggio siero-positivizzazione post-infettiva o post-vaccinale - monitoraggio terapeutico (plasma iperimmune, ab monoclonali) - non usare di norma a scopo diagnostico
Caratteristiche analitiche	<p>Target antigenico</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'antigene (ag) S e N sono considerati equivalenti (simile sensibilità diagnostica) - gli ab neutralizzanti vanno determinati con saggi basati su proteina S e/o RBD - i produttori devono garantire il monitoraggio e l'eventuale ridefinizione del target in funzione delle nuove varianti <p>Classe di Immunoglobuline</p> <ul style="list-style-type: none"> - devono essere determinate le IgG (in alternativa gli ab totali) - la determinazione delle IgA può essere utile - la determinazione delle IgM è sconsigliata <p>Caratteristiche del saggio</p> <ul style="list-style-type: none"> - preferire i saggi quantitativi rispetto ai qualitativi o semi-quantitativi - il monitoraggio deve essere eseguito con lo stesso saggio e sulla stessa piattaforma analitica - in caso di elevata numerosità, preferire piattaforme ad elevata produttività <p>Validazione analitica e clinica</p> <ul style="list-style-type: none"> - i saggi devono essere validati o verificati in accordo alla norma ISO 15189:2012. Devono essere valutati: sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica; valore soglia decisionale; imprecisione; linearità.
Introduzione nella pratica clinica	<p>Deve essere concordata tra i Professionisti della MdL, i Clinici e la Direzione Sanitaria/Medica</p> <p>Le matrici alternative (saliva, sangue capillare) devono essere attentamente valutate</p> <p>Definire accuratamente la tempistica del monitoraggio vaccinale:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1-7 giorni prima della prima dose - 1-2 settimane dopo l'ultima dose - ogni 3 mesi successivi fino alla siero-negativizzazione <p>Per le tecniche diagnostiche rapide devono essere stilate procedure operative supervisionate da professionisti della MdL</p>
Controllo di Qualità	<p>CQI: utilizzare anche materiale di terza parte e/o campioni di pazienti debitamente conservati</p> <p>VEQ: adesione a programmi gestiti da provider di terza parte di provata competenza</p>
Espressione dei risultati	<p>Il fruitore del risultato deve essere debitamente informato e conoscere il significato clinico e le possibili criticità dell'esame</p> <p>Evidenziare sempre la negatività o positività sierologica, riportando possibilmente il livello ab</p> <p>Inserire i risultati nel sistema informatico e garantirne l'accessibilità mediante fascicolo sanitario elettronico</p> <p>Il referto deve contenere: il metodo utilizzato, la classe ab determinata, il target ag, il livello ab, le unità di misura, il valore soglia di positività</p> <p>In situazione di carente standardizzazione, i risultati generati da metodi diversi non possono essere comparati tra di loro, né i diversi metodi possono essere utilizzati alternativamente</p> <p>In caso di metodiche "rapide", queste devono essere eseguite da personale debitamente formato alla esecuzione e alla interpretazione dell'esame, e deve essere prevista la consulenza da parte di Professionisti della MdL</p>

ab, anticorpo; ag, antigene; MdL, medicina di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- Istituto Superiore di Sanità. Le Pandemie Influenzali del Ventesimo Secolo. Disponibile su: <https://www.epicentro.iss.it/passi/storiePandemia>: ultimo accesso: Gennaio 2021.
- Lippi G, Plebani M. The novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak: think the unthinkable and be prepared to face the challenge. *Diagnosis (Berl)* 2020;26;7:79-81.
- Ganesh B, Rajakumar T, Malathi M, et al. Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. *Clin Epidemiol Glob Health* 2021 doi: 10.1016/j.cegh.2020.100694.
- Lavine JS, Bjornstad ON, Antia R. Immunological characteristics govern the transition of COVID-19 to endemicity. *Science* 2021 doi: 10.1126/science.abe6522.
- Connors M, Graham BS, Lane HC, et al. SARS-CoV-2 Vaccines: much accomplished, much to learn. *Ann Intern Med* 2021 doi: 10.7326/M21-0111.
- Lippi G, Plebani M. A modern and pragmatic definition of Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1171.
- Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1063-9.
- Bohn MK, Lippi G, Horvath A, et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1037-52.
- Plebani M. Il valore della medicina di laboratorio nella pandemia da SARS-CoV-2. *Biochim Clin* 2020;44:SS1 1-2.
- Lippi G, Salvagno GL, Mattiuzzi C. Guida sintetica alla diagnostica della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020;44:SS1 3-4.
- Fierz W. Basic problems of serological laboratory diagnosis. *Methods Mol Med* 2004;94:393-427.
- Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;6:CD013652.
- Wang H, Ai J, Loeffelholz MJ, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serology tests for COVID-19: impact of assay design and post-symptom-onset intervals. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:2200-11.
- Bohn MK, Loh TP, Wang CB, et al. IFCC Interim Guidelines on serological testing of antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2001-8.
- Post N, Eddy D, Huntley C, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* 2020;15:e0244126.
- Pisanic N, Randad PR, Kruczynski K, et al. COVID-19 Serology at population scale: SARS-CoV-2 specific antibody responses in saliva. *J Clin Microbiol* 2020;59:e02204-20.
- Crawford KHD, Dingens AS, Eguia R, et al. Dynamics of neutralizing antibody titers in the months after SARS-CoV-2 infection. *J Infect Dis* 2020 doi: 10.1093/infdis/jiaa618.
- Lippi G, Mattiuzzi C. Clinical value anti-SARS-COV-2 serum IgA titration in patients with COVID-19. *J Med Virol* 2020 doi: 10.1002/jmv.26539.
- Liu ZL, Liu Y, Wan LG, et al. Antibody profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Clin Chem* 2020;66:1102-4.
- Wolff F, Dahma H, Duterme C, et al. Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020;98:115140.
- Chen X, Pan Z, Yue S, et al. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5:180.
- Caturegli G, Materi J, Howard BM, et al. Clinical validity of serum antibodies to SARS-CoV-2: A Case-Control study. *Ann Intern Med* 2020;173:614-2.
- Plebani M, Padoan A, Negrini D, et al. Diagnostic performances and thresholds: The key to harmonization in serological SARS-CoV-2 assays? *Clin Chim Acta* 2020;509:1-7.
- Lucas C, Klein J, Sundaram M, et al. Kinetics of antibody responses dictate COVID-19 outcome. *medRxiv [Preprint]*. 2020. doi: 10.1101/2020.12.18.20248331.
- Lippi G, Sciacovelli L, Trenti T, et al. Cinetica e caratteristiche biologiche della risposta umorale all'infezione da SARS-CoV-2: implicazioni vaccinali. *Biochim Clin* 2021 doi: 10.19186/BC_2021.001.
- Mahase E. Covid-19: Past infection provides 83% protection for five months but may not stop transmission, study finds. *BMJ* 2021;372:n124.
- Ledford H. COVID reinfections are unusual - but could still help the virus to spread. *Nature* 2021 doi: 10.1038/d41586-021-00071-6.
- Sewell HF, Agius RM, Kendrick D, et al. Stewart M. Covid-19 vaccines: delivering protective immunity. *BMJ* 2020;371:m4838.
- Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 2021 doi: 10.1038/s41586-021-03207-w.
- Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021 doi: 10.1126/science.abf4063.
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020;383:2603-15.
- Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* 2020 doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
- Mahase E. Covid-19: What new variants are emerging and how are they being investigated? *BMJ* 2021;372:n158.
- Yang Z, Wu J, Ye F, et al. Expert consensus-based laboratory testing of SARS-CoV-2. *J Thorac Dis* 2020;12:4378-90.
- Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, et al. Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: A Meta-analysis. *Diagnostics (Basel)* 2020;10:319.
- Tacker DH, Bashleben C, Long TC, et al. Inter-laboratory agreement of anti-severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) serologic assays in the Expedited College of American Pathologists Proficiency Testing Program. *Arch Pathol Lab Med* 2021 doi: 10.5858/arpa.2020-0811-SA.
- Patel EU, Bloch EM, Clarke W, et al. Comparative performance of five commercially available serologic assays to detect antibodies to SARS-CoV-2 and identify individuals with high neutralizing titers. *J Clin Microbiol* 2020 doi: 10.1128/JCM.02257-20.
- Tang MS, Case JB, Franks CE, et al. *Clin Chem* 2020 doi: 10.1093/clinchem/hvaa211.
- Rychert J, Couturier MR, Elgort M, et al. Evaluation of three SARS CoV-2 IgG antibody assays and correlation with neutralizing antibodies. *J Appl Lab Med* 2020 doi: 10.1093/jalm/jfaa188.
- Bal A, Pozzetto B, Trabaud MA, et al. Evaluation of high-throughput SARS-CoV-2 serological assays in a longitudinal cohort of patients with mild COVID-19: clinical sensitivity, specificity and association with virus neutralization test. *Clin Chem* 2021 doi: 10.1093/clinchem/hvaa336.

41. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M, et al. Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine* 2020;62:103101.
42. Commissione Europea. COVID-19 In vitro diagnostic devices and test methods database. Disponibile su: <https://covid-19-diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices>. Ultimo accesso: Gennaio 2021.
43. Food and Drug Administration. EUA Authorized Serology Test Performance. Disponibile su: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>. Ultimo accesso: Gennaio 2021.
44. Foundation for Innovative New Diagnostics. Disponibile su: <https://finddx.shinyapps.io/COVID19DxData/>. Ultimo accesso: gennaio 2021.
45. COVID-19 Evidence Commons. Disponibile su: <https://chs.asu.edu/diagnostics-commons/evidence-commons>. Ultimo accesso: Gennaio 2021.
46. Lippi G, Plebani M. SARS-CoV-2 antibodies titration: a reappraisal. *Ann Transl Med* 2020;8:1032.
47. Lippi G. Potential drawbacks of SARS-COV-2 seroprevalence surveys. *J Hosp Infect* 2020 doi: 10.1016/j.jhin.2020.12.011.
48. Plebani M. SARS-CoV-2 antibody-based SURVEILLANCE: New light in the SHADOW. *EBioMedicine* 2020;61:103087.
49. Lippi G, Henry BM, Sanchis-Gomar F. Potential drawbacks of frequent asymptomatic coronavirus disease 2019 (COVID-19) testing. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020 doi: 10.1017/ice.2020.1305.
50. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *bioRxiv* 2021 doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.15.426911>.
51. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma *bioRxiv* 2021 doi: 10.1101/2021.01.18.427166.
52. Xu G, Emanuel AJ, Nadig S, , et al. Evaluation of orthogonal testing algorithm for detection of SARS-CoV-2 IgG antibodies. *Clin Chem.* 2020. doi: 10.1093/clinchem/hvaa210.
53. Lippi G, Plebani M. Opportunities and drawbacks of nonstandard body fluid analysis. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:907-9.
54. Haselmann V, Özçürümez MK, Klawonn F, et al. Results of the first pilot external quality assessment (EQA) scheme for anti-SARS-CoV2-antibody testing. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:2121-30.

Lab Tests Online Italia. Attività del 2020

Gianni Messeri¹, Margherita Berardi², Francesca Biancalani³

¹Comitato di coordinamento LTO

²Gestore del sito e delle reti sociali

³Responsabile delle traduzioni

L'attività del sito labtestsonline.it (LTO) è proseguita con successo anche nel 2020, nonostante le possibili difficoltà inerenti ai problemi della pandemia. Il numero di accessi annui (5 747 181) è risultato solo di poco inferiore, circa il 7%, nei confronti del 2019 (6 150 069). Tale diminuzione è stata verificata, ed in misura spesso maggiore, anche nel sito di USA (-7%), UK (-8%), Spagna (-14%), Francia (-64%). Da notare che il numero medio di accessi mensili (478 932) è risultato di gran lunga il più elevato di tutti i siti LTO ad esclusione di quello USA. In Figura 1 è riportato l'andamento mensile degli ultimi tre anni, dal quale appare decisivo, al fine degli accessi, l'attivazione delle reti sociali: Twitter: @LabTestIT e Facebook @SIBioCmedicinadilaboratorio. Relativamente al contenuto degli articoli, sono stati valutati i 50 articoli più visitati e nella Tabella 1 sono riportati i primi 10. Vale la pena notare come questi accessi abbiano riguardato solo articoli relativi agli esami; quelli relativi alle patologie figurano solo 4 volte nei primi 50.

Nel corso del 2020 sono stati tradotti ed aggiunti al sito italiano 19 esami (il totale somma ora a 354), 13 patologie (totale 134) e 12 notizie (totale 33). In accordo con l'impostazione di LTO secondo la quale dovrebbero essere presenti nel sito solo articoli rivisti da non oltre 3 anni, sono stati effettuati 154 aggiornamenti di esami e patologie. Sono stati pubblicati anche 38 post su Facebook ed altrettanti su Twitter.

È stata proseguita ed incrementata l'attività del Comitato di Consulenza, costituito da 33 specialisti di laboratorio competenti nelle varie aree coperte da LTO. Attualmente, 133 articoli sono stati sottoposti ai revisori; di questi, 75 sono già stati rivisti, alcuni in misura assai consistente, e pubblicati sul sito col nome del/dei revisori. Attraverso questo processo, LTO si caratterizza sempre di più come strumento SIBioC di informazione nei confronti dei cittadini Italiani.

Anche per il 2021 è stata rinnovata ad LTO la Certificazione "HON Code (Health On the NeT)" che garantisce l'ottemperanza alle norme di qualità e sicurezza richieste per i siti impegnati nell'informazione di carattere sanitario.

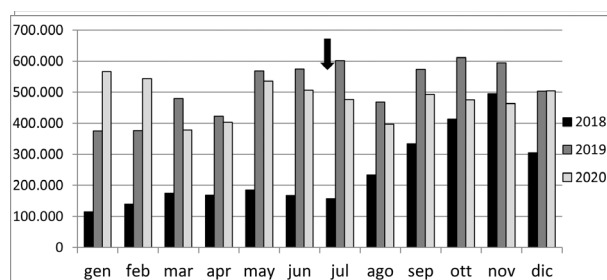


Figura 1
Accessi mensili negli anni 2018-2020. La freccia indica l'avviamento di Facebook e Twitter

Tabella 1
Prime 10 visualizzazioni nel 2020

Titolo pagina visitata	Visualizzazioni
Immunoglobuline (IgG, IgA, IgM)	386 936
Anticorpi anti virus Epstein-Barr (EBV)	148 945
Anticorpi anti-nucleo (ANA)	135 110
Test Coronavirus (COVID-19)	123 356
Proteina C reattiva (PCR)	107 769
Esami sierologici per COVID-19	85 332
Lattico Deidrogenasi (LDH)	82 665
IgE Totali	73 522
Carenza di Vit. B12 e di Acido Folico	71 373
Marcatori Tumorali	68 339

Corrispondenza a: Gianni Messeri, Comitato Coordinamento LTO Italia, E-mail messeri.gianni@gmail.com, Tel 3356819970

Ricevuto: 22.01.2021

Revisionato: 27.01.2021

Accettato: 27.01.2021

Pubblicato on-line: 10.02.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.004

L'Emogasanalizzatore Stat Profile® Prime Plus aiuta la gestione dei pazienti critici COVID-19 grazie all'esclusivo menu di test di point-of-care

L'analisi EmoGas puo' aiutare la gestione dei pazienti critici COVID-19. L' Emogasanalizzatore Nova Stat Profile Prime Plus è la strumentazione ideale per i reparti di terapia intensiva e semi-intensiva in quanto, oltre ai parametri standard, permette con un unico campionamento, la possibilità di eseguire altri esami aggiuntivi utili alla lotta al Covid-19 quali:

- Urea (Bun),
- Creatinina (Creat),
- Magnesio Ionizzato (iMg)

Menù:

pH, PCO_2 , PO_2 , Na^+ , K^+ , Cl^- , iCa, Glu, Lac, Hct, TCO_2 , $SO_2\%$, O_2Hb , COHb, MetHb, HHb, tBil, tHb, HbF, ePV

...più Urea (BUN), Creat e iMg



Complicanze del paziente critico COVID-19	Parametri Point of Care
Sindrome da distress respiratorio acuto	PO_2 , PCO_2 , pH, HCO_3^- , SaO_2 , PO_2/FiO_2 , OI
Insufficienza respiratoria di tipo I.	PO_2 , PCO_2 , pH, HCO_3^- , SaO_2 , PO_2/FiO_2 , OI
Lesioni cardiache acute: • Con anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari • Senza anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari	iCa, K^+ , iMg, ePV
Insufficienza cardiaca • Con anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari • Senza anamnesi di ipertensione o malattie cardiovascolari	iCa, K^+ , iMg, ePV
Sepsi	Lattato, Glucosio, BUN/Creatinina, iCa, K^+ , iMg
Acidosi	PCO_2 , pH, HCO_3^-
Alcalosi	PCO_2 , pH, HCO_3^-
Lesione renale acuta	BUN/Creatinina, iCa, K^+ , iMg
Equilibrio elettrolitico	Na^+ , K^+ , iCa, iMg, Cl, Gap Anionico
Shock	Lattato
Lesione epatica acuta	Bilirubina

Iscriviti al **Webinar On Demand** e scopri come l'Emogasanalizzatore Nova Stat Profile Prime Plus aiuta la gestione dei pazienti critici COVID-19





BIO MEDIA

La condivisione del sapere

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



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

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