
BC

biochimica clinica

In questo numero:

CONTRIBUTI DEI GDS SIBioC
vedi pag. 226, 248, 256, 290, 312

TEMI ETICI IN MEDICINA DI LABORATORIO
vedi pag. 299 e 305

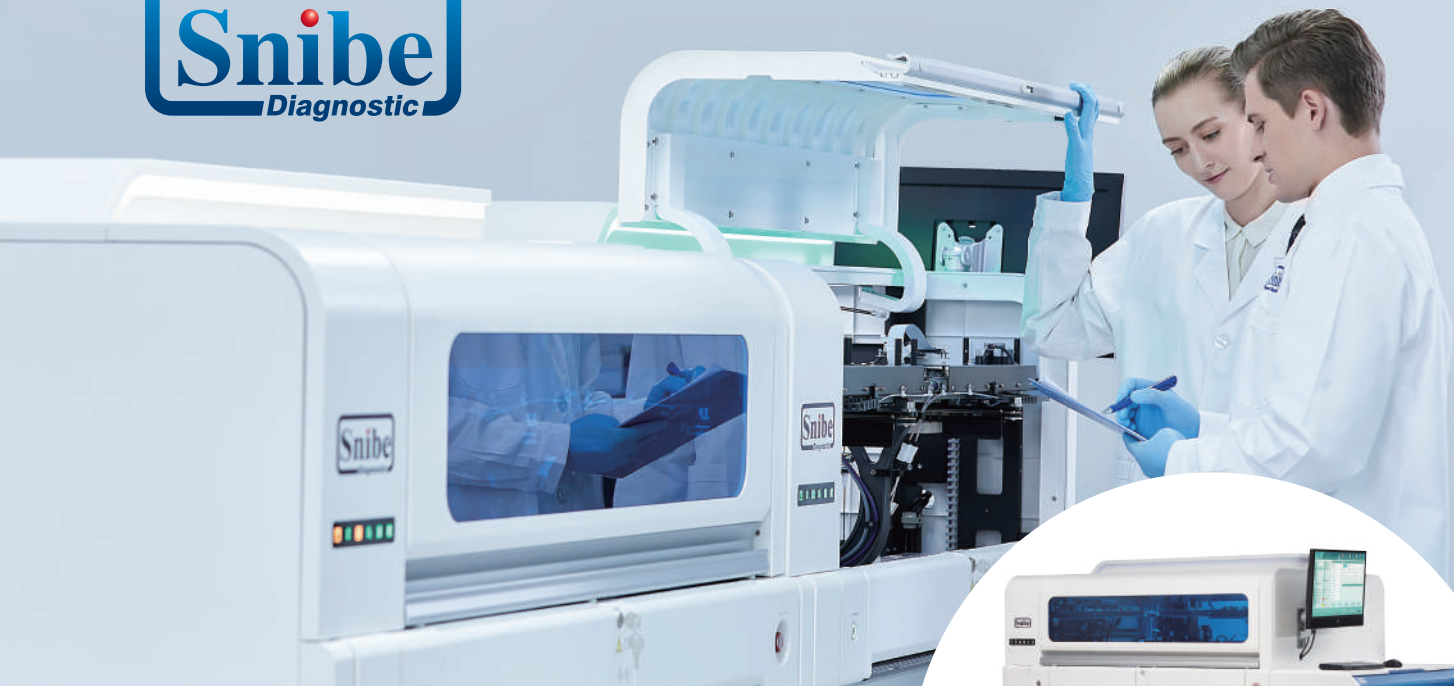


SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di

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



 **BIOMEDIA**
La condivisione del sapere



Modulo Singolo con la più Alta Produttività al Mondo

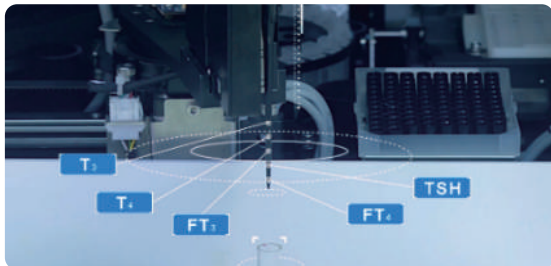


MAGLUMI® X8

X8 Vantaggi Tecnici

Campionamento

- Puntali monouso
- Un pipettamento per test multipli



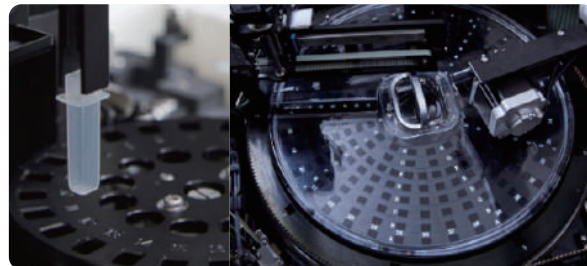
Misurazione

- Controllo bidirezionale della temperatura
- Misurazioni stabili ed accurate



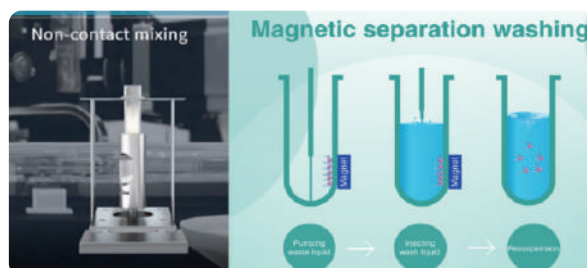
Incubazione

- Design di cuvetta singola
- Incubazione costante a 360° a 37±0,3°C



Miscelazione e lavaggio

- Unità di miscelazione a vortice senza contatto
- Lavaggio ad alta efficienza in 4 fasi



*Per maggiori informazioni prego contattare Medical Systems S.p.A

 **MEDICAL SYSTEMS S.p.A.**

www.medicalsystems.it

Follow Us on



www.snibe.com

sales@snibe.com

sommario

3

EDITORIALI

226

L'importante contributo dei Gruppi di Studio SIBioC nell'ambito del percorso di promozione del ruolo della Medicina di Laboratorio
G. Palladini, M. Montagnana

228

Valutazione della risposta anticorpale post-vaccino COVID-19: fiat lux
M. Plebani, G. Banfi, G. Lippi

RASSEGNE

230

Analisi dei livelli trascrizionali di ciclina D1 nello studio delle discrasie plasmacellulari: revisione sistematica della letteratura
A. Nevone, P. Cascino, M. Girelli, C. Scopelliti, M. Bozzola, MA. Sesta, J. Ripepi, P. Milani, M. Basset, G. Palladini, M. Nuvolone

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

242

Evaluation of the antiproliferative effect of *Bifidobacterium longum* BB-536 in solid tumor cell lines, co-cultured with murine splenocytes
L. Tripodi, M. Passariello, V. D'Argenio, E. Leggiero, M. Vitale, R. Colicchio, P. Salvatore, V. Cerullo, C. De Lorenzo, L. Pastore

248

Adesione alle raccomandazioni dei gruppi di studio SIBioC-SIPMeL (Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio) e SID (Società Italiana di Diabetologia) sulla fase preanalitica per la determinazione della glicemia: ancora margini di miglioramento. Risultati di una indagine conoscitiva nazionale per il Gruppo di Studio intersocietario SIBioC-SIPMeL "Diabete Mellito" e per il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità Extra-Analitica del dato di laboratorio
A. Terreni, M. Carta, D. Giavarina, V. Miconi, A. Mosca, G. Bonetti

256

Questionario conoscitivo sull'Esame Chimico Morfologico delle Urine in Italia a cura del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica dell'Apparato Urinario
R. Ravasio, MA. Burgio, F. Balboni, F. Manoni

267

Sistema Nazionale di Allerta Precoce, una piattaforma web per il contrasto alla diffusione delle Nuove Sostanze Psicoattive
MR. Vari, S. Zaami, R. Pacifici, S. Pichini, P. Berretta, M. Sciotti, R. Tittarelli, N. La Maida, A. Tini, E. Marinelli, E. Buscaglia, E. Brambilla, G. Scaravaggi, CA. Locatelli, FP. Busardò, M. Cavallo, S. Graziano

281

Identificazione di positività al SARS-CoV-2 attraverso metodi di Machine Learning sui dati dell'esame emocromocitometrico: validazione esterna di modelli allo stato dell'arte
A. Carobene, A. Campagner, A. Sulejmani, V. Leoni, M. Seghezzi, S. Buoro, F. Cabitza

OPINIONI

290

Comunicare nell'infosfera: sfide e opportunità per la Medicina di Laboratorio
V. D'Argenio, E. Iorio, R. Tomaiuolo, C. Bellini, M. Lenski, E. Giannella, M. Berardi, S. Fares Taie, G. Sancesario

299

Ricerca sul materiale biologico: ritorno al futuro
G. Sancesario, P. Pezzati

sommario

DOCUMENTI

305

Raccomandazione CM/Rec(2016)6 della Commissione dei Ministri agli Stati Membri sull'utilizzo di campioni biologici di origine umana per scopi di ricerca (Adottata dalla Commissione dei Ministri l'11 maggio 2016 al 1256° incontro dei Delegati dei Ministri)

G. Sancesario, P. Pezzati

DOCUMENTI SIBioC

312

Principi per l'implementazione e la gestione del point-of-care-testing (poc): indicazioni essenziali

per il Gruppo di Studio Point of Care Testing (POCT)

E. Rampoldi, G. Patrucco, M. Casati, B. Morelli, P. Carraro

LETTERE ALL'EDITORE

327

Procalcitonin may help in diagnosing bacterial infections in COVID-19 patients during high-dose steroid therapy

A. Batirel, N. Eser, E. Korlu, ME. Tezcan

CASI CLINICI

e20

Neuromielite ottica in età pediatrica: il laboratorio può essere utile?

G. Musso, M. Nosadini, N. Gallo, S. Sartori, M. Seguso, M. Plebani

e23

Informazioni inaspettate dall'esame emocromocitometrico:

variante emoglobinica Hb Leiden rilevata tramite un analizzatore ematologico

FGR. Viola, M. Iozzo, R. Ruggia, S. Casciani, L. D'Amore,

G. Falconi, C. Priori, S. Bernardini, R. Massoud

SAVE THE DATE

53° Congresso Nazionale SIBioC-Medicina di Laboratorio

LA MEDICINA DI LABORATORIO
NELLA MEDICINA DI PROSSIMITÀ:
telemedicina, ruoli e competenze

DIAGNOSE

MEDICAL CARE

Medicina di Laboratorio

SIBioC

TREATMENT

ACCIDENT

11-13 OTTOBRE 2021
VIRTUAL EDITION

un evento
organizzato da



BIOMEDIA
La condivisione del sapere

<https://sibioc.congressonazionale.com>

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

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.

Volume 45

Numero 3 - Settembre 2021

Milano, Settembre 2021

Cari Colleghi,

come noto il laboratorio clinico gioca un ruolo molto importante nella sorveglianza della gravidanza, perché si tratta di seguire lo stato di salute di due soggetti, quello della madre e quello del feto. E di fatto entrambi interagiscono tra loro, con una serie di cambiamenti fisiologici ed ormonali di grande rilievo, e con conseguente adattamento nei metabolismi glicidico, lipidico e proteico. È altresì noto che solo sul tema degli intervalli di riferimento non ci sia consenso per diversi parametri (quelli relativi alla funzionalità tiroidea, solo per fare un esempio), sia per le gravidanze fisiologiche che per quelle complicate da varie patologie.

Infine, lo screening prenatale è un altro punto importante per la gestione della gravidanza, e la rapida evoluzione delle tecnologie ha fatto sì che anche questo complesso di esami, cadenzati in più occasioni durante la gravidanza, richiedano grande attenzione per la loro interpretazione, soprattutto ai fini dei loro rispettivi valori predittivi.

Biochimica Clinica ritiene che tali tematiche siano così rilevanti per la professione da meritare una trattazione particolarmente approfondita, ed è stato così deciso di dedicare una monografia a questa diagnostica. È infatti fondamentale che tutti coloro interessati (laboratoristi e clinici) siano informati non solo delle caratteristiche analitiche e diagnostiche dei vecchi e nuovi biomarcatori, ma anche delle possibili criticità correlate all'appropriatezza della richiesta, soprattutto focalizzata sulla conoscenza della finestra diagnostica del biomarcatore, e sull'interpretazione corretta dei risultati nella pratica clinica.

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

Il termine per l'invio dei manoscritti è fissato per il 31 Gennaio 2022; questi saranno come sempre sottoposti all'esame da parte di revisori specializzati al fine di garantirne l'accettabilità scientifica.

Con i più cordiali saluti,

Maria Stella Graziani
*Editor in chief di Biochimica Clinica*Andrea Mosca (SIBioC)
Elisabetta Torlone
(Associazione Medici Diabetologi-AMD;
Società Italiana di Diabetologia-SID)
Guest Editors per il numero monografico

L'importante contributo dei Gruppi di Studio SIBioC nell'ambito del percorso di promozione del ruolo della Medicina di Laboratorio

Giovanni Palladini, Martina Montagnana

Coordinatori della Divisione Scientifica della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

Questo fascicolo di Biochimica Clinica, nel quale sono inclusi ben quattro contributi frutto del lavoro di Gruppi di lavoro societari (GdS), è testimonianza della vivace attività formativa e scientifica della nostra Società.

Attuare interventi finalizzati all'educazione dei soci, *in primis* mediante stesura, pubblicazione e divulgazione di documenti in grado di guidare l'attività quotidiana del professionista della Medicina di Laboratorio, è uno degli obiettivi prioritari della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC), fin dalle sue origini. Coerentemente con questa mission, uno dei principali e specifici compiti dei GdS societari ed inter-societari che afferiscono alla Divisione Scientifica, è proprio "l'emissione e la divulgazione di documenti di consenso" (1).

In questo contesto, assume particolare rilievo il contributo di Rampoldi E, et al., pubblicato in questo numero di Biochimica Clinica (2), che rappresenta un aggiornamento del documento "Raccomandazioni per l'implementazione e la gestione del POCT" pubblicato nel 2011 dal GdS Point of Care Testing (POCT) (3). Il nuovo documento integra il precedente e fornisce indicazioni attuali su connettività, formazione e gestione del rischio clinico, aspetti essenziali per un approccio complessivo alla gestione della rete dei POCT. Viene inoltre dato ampio risalto a tutte le attività svolte nella pratica quotidiana, e che rientrano nel sistema di assicurazione della qualità conforme a documenti riconosciuti a livello internazionale, al fine di garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti utilizzando sistemi POCT.

Nell'ambito del percorso di standardizzazione ed armonizzazione nel quale i soci SIBioC sono attivamente coinvolti sia in ambito nazionale che internazionale, e che deve riguardare tutte le fasi che compongono l'intero processo relativo agli esami di laboratorio (4), la qualità delle attività della fase pre-analitica, tra le quali la corretta raccolta del campione, è un presupposto indispensabile per arrivare a fornire al clinico un'informazione realmente utile (5).

In linea con questo obiettivo, il GdS inter-societario ed inter-disciplinare SIBioC-SIPMeL "Diabete Mellito" ed il GdS SIBioC "Variabilità Extra-Analitica del dato di laboratorio" presentano in questo numero di Biochimica Clinica i risultati di un'indagine conoscitiva, volta a verificare la conoscenza e l'impatto nei laboratori italiani (6), a distanza di alcuni anni dall'emanazione, delle indicazioni sulla fase pre-analitica della determinazione della glicemia (7). Ciò che si evince dall'analisi dei questionari, come sottolineato da Terreni A, et al., è che pur dimostrando i professionisti di avere una conoscenza dei documenti diffusi da SIBioC, esiste un'oggettiva difficoltà nel trasferimento delle evidenze scientifiche nella pratica quotidiana di alcune realtà operative. I due GdS si prefiggono quindi, come obiettivo per i prossimi anni, di favorire l'implementazione delle raccomandazioni, continuando a lavorare in sinergia con le principali società cliniche e cercando anche di creare rapporti con altri portatori di interesse (stakeholders), onde consentire una più capillare applicazione delle indicazioni per una corretta determinazione della glicemia.

Un ulteriore esempio di proficua collaborazione e dialogo costruttivo tra specialisti della Medicina di Laboratorio e specialisti clinici, finalizzato alla stesura di algoritmi diagnostici e di monitoraggio utili nella pratica clinica routinaria, è il contributo del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica dell'Apparato Urinario (GIAU), nel quale confluiscono decine di specialisti di laboratorio e clinici di diverse società scientifiche [SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL), Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI), Società Italiana di Nefrologia (SIN)]. Nel lavoro pubblicato in questo numero della rivista sono descritti i risultati di un questionario conoscitivo finalizzato a verificare i cambiamenti avvenuti nel corso degli anni nell'approccio all'esame chimico-fisico e microscopico delle urine (ECMU), e valutare il livello di conoscenza e applicazione delle raccomandazioni disponibili (8). I risultati del questionario, realizzato dopo la pubblicazione delle linee guida delle fasi pre-, analitica e post-analitica sulla nostra rivista (9-11), hanno evidenziato un notevole progresso rispetto al passato in alcuni ambiti dell'ECMU, mentre per altri si osservano spazi di miglioramento. L'ECMU, se richiesto in modo appropriato e

Corrispondenza a: Martina Montagnana, Sezione di Biochimica Clinica Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Verona, E-mail martina.montagnana@univr.it

Ricevuto: 18.06.2021

Accettato: 21.06.2021

Pubblicato on-line: 19.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.054

integrando le informazioni ottenute con gli altri strumenti a disposizione del clinico, è infatti uno strumento essenziale per una corretta diagnosi delle malattie dell'apparato urinario. Questo contributo è pertanto espressione del ruolo della nostra Società Scientifica, attraverso il prezioso lavoro dei gruppi operativi, nell'ottimizzare l'uso degli esami di laboratorio e delle informazioni fornite al clinico. L'appropriatezza prescrittiva rappresenta una costante sfida in tutti gli ambiti della medicina, e l'obiettivo di perseguire l'appropriatezza può essere raggiunto soltanto mediante attuazione di una ampia strategia, che preveda anche il coinvolgimento dei clinici nei gruppi di studio.

Questo numero di *Biochimica Clinica* è infine arricchito da un interessante contributo del Gruppo "Young Scientists" (12), i cui contenuti sono stati in parte trattati nella sessione "Young Scientists" dell'edizione virtuale del 52° Congresso Nazionale SIBioC 2020, dedicata all'importanza della gestione della comunicazione scientifico-sanitaria mediante "social media", in particolare durante la pandemia da SARS-CoV-2. Come sottolineato nel lavoro di D'Argenio et al., per garantire l'affidabilità dell'informazione medica sono necessari siti certificati, nei quali le informazioni scientifiche siano verificate da esperti. Una testimonianza di quanto affermato è rappresentata da LabTestsOnline (LTO), promosso dall'American Association of Clinical Chemistry (AACC) e tradotto in italiano con il contributo di SIBioC. Il sito, messo a disposizione sia dei professionisti che dei cittadini, ha raggiunto negli ultimi tempi un successo di accessi davvero ragguardevole fornendo informazioni sanitarie del tutto affidabili (13).

Il contributo del gruppo "Young Scientists" è anche testimonianza di quanto la nostra Società Scientifica si stia sempre più arricchendo della partecipazione di validi giovani professionisti della Medicina di Laboratorio, in grado di mettere in atto un approccio alla disciplina innovativo e dinamico.

Siamo convinti che la lettura di questi contributi e l'applicazione nella pratica quotidiana delle indicazioni fornite, porterà un deciso miglioramento alla armonizzazione e alla qualità della Medicina di Laboratorio in Italia.

Come Coordinatori della Divisione Scientifica, e in linea con quanto auspicato dal Consiglio Direttivo della Società, ci auguriamo che l'impegno profuso dai GdS al servizio dei nostri Soci e di tutta la Medicina di Laboratorio continui nel tempo e, auspicabilmente, si potenzi nei prossimi anni.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento SIBioC. <https://sibioc.it/regolamento/> (ultimo accesso: giugno 2021).
2. Rampoldi E, Patrucco G, Casati M, et al, per il Gruppo di Studio Point of Care Testing (POCT). Principi per l'implementazione e la gestione del point-of-care-testing (poc): indicazioni essenziali. *Biochim clin* 2021;45:312-26.
3. Di Serio F, Trenti T, Carraro P, per il Gruppo di Studio SIBioC "Point-of-care testing. Raccomandazioni per l'implementazione e la gestione del "point-of-care testing" (POCT). *Biochim Clin* 2011;35:242-52.
4. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: requests, samples, measurements and reports. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53:184-96.
5. Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:229-41.
6. Terreni A, Carta M, Giavarina D, et al, per il Gruppo di Studio intersocietario SIBioC-SIPMeL "Diabete Mellito" e per il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità Extra-Analitica del dato di laboratorio. Adesione alle raccomandazioni dei gruppi di studio SIBioC-SIPMeL (Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio) e SID (Società Italiana di Diabetologia) sulla fase preanalitica per la determinazione della glicemia: ancora margini di miglioramento. Risultati di una indagine conoscitiva nazionale. *Biochim Clin* 2021;45:248-55.
7. Bonetti G, Carta M, Lapolla A, et al. Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico. *Biochim Clin* 2018;42:263-5.
8. Ravasio R, Burgio MA, Balboni F, et al. Questionario conoscitivo sull'Esame Chimico Morfologico delle Urine in Italia a cura del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica dell'Apparato Urinario. *Biochim Clin* 2021;45:256-66.
9. Manoni F, Caleffi A, Gessoni G, et al. L'esame delle urine chimico morfologico e colturale: proposta di linee guida per una procedura standardizzata della fase preanalitica. *Biochim Clin* 2011;35:131-9.
10. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al. Esame Fisico, Chimico e Morfologico delle Urine: proposta di linee guida per la fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU). *Biochim Clin* 2016;4:353-82.
11. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al. Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: raccomandazioni per la fase postanalitica del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica Apparato Urinario (GIAU). *Biochim Clin* 2020;44:86-99.
12. D'Argenio V, Iorio E, Tomaiuolo R, et al. Comunicare nell'infosfera: sfide e opportunità per la Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2021;45:290-8.
13. Messeri G, Berardi M, Biancalani F. Lab Tests Online Italia. Attività del 2020. *Biochim Clin* 2021;45:100.

Valutazione della risposta anticorpale post-vaccino COVID-19: fiat lux

Mario Plebani¹, Giuseppe Banfi², Giuseppe Lippi³

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

²IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano, Italia e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

³Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona, Verona

Lo studio della risposta immunitaria verso SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) ha assunto importanza rilevante fin dall'inizio della pandemia da COVID-19 (coronavirus disease 2019), e risulta ancor più importante oggi nel contesto dello sviluppo di nuovi vaccini e nella valutazione dell'efficacia di quelli approvati ed utilizzati nella pratica clinica (1).

Benché la risposta adattativa al virus sia determinata dall'insieme di varie componenti, lo studio degli anticorpi specifici, soprattutto quelli neutralizzanti, è l'aspetto più studiato e valutato, tanto da essere stato oggetto di lavori sperimentali ed editoriali, quali ad esempio quello pubblicato su *Lancet Infectious Diseases* nell'Aprile scorso, che reca un titolo emblematico "*The important role of serology for COVID-19 control*" (2). Questo editoriale, come altri pubblicati su prestigiose riviste scientifiche, ha chiarito i limiti, ma anche la reale utilità clinica dell'analisi sierologica, enfatizzando l'importanza di valutare i rapporti fra anticorpi e anticorpi neutralizzanti, che rimangono il reale riferimento per valutare la risposta immunitaria umorale del soggetto all'infezione.

Attualmente, a fronte dello sviluppo di oltre 270 candidati vaccini, 90 dei quali nella fase di trial clinico, la valenza della sierologia anti-SARS-CoV-2 assume maggiore rilievo. I vaccini attualmente approvati per uso clinico si associano ad una risposta immunitaria, l'efficacia della quale è valutata prevalentemente mediante determinazione anticorpale, ed in particolare misurando gli anticorpi diretti contro la proteina spike (S) del virus o il receptor binding domain (RBD) della stessa proteina S (1). L'analisi dei risultati degli studi clinici di sette vaccini attualmente in uso ha dimostrato come gli anticorpi anti-S rappresentino un correlato idoneo di protezione, ed ancor più hanno documentato una stretta relazione fra titolo di anticorpi neutralizzanti ed efficacia vaccinale, quanto meno nel prevenire le forme più gravi di malattia (ospedalizzazione, ricorso a ventilazione meccanica, ricovero in terapia intensiva, letalità) (3).

Lo studio della cinetica di risposta anticorpale e la sua eterogeneità correlata a variabili quali età, sesso, indice di massa corporea, patologie croniche ed utilizzo di farmaci immunosoppressori, in epoca di medicina di precisione, permette anche in questo settore di ribadire che "*one size does not fit all*" (4), ossia che specialmente in alcune categorie di soggetti e pazienti, l'analisi anticorpale dovrebbe essere utilizzata per verificare la qualità della risposta immune e per guidare successive decisioni cliniche e terapeutiche, finanche l'utilizzo di dosi ulteriori di vaccino (boost) in soggetti in cui si riscontri una modesta/insufficiente risposta anticorpale alla dose consueta e raccomandata (5). Sempre in tema di medicina di precisione, una valutazione del titolo basale di anticorpi neutralizzanti anti-SARS-CoV-2 consente di razionalizzare la somministrazione delle dosi successive di vaccino (ad esempio evitando la seconda dose, quando previsto, o riducendo il dosaggio, mantenendo inalterata l'efficacia nei pazienti che abbiano già sviluppato la cosiddetta "memoria immunologica") (6). Inoltre, lo studio degli anticorpi specifici e dell'eventuale capacità delle nuove varianti di evadere (almeno parzialmente) l'attività neutralizzante, rappresentano altri motivi per suggerire una loro razionale utilizzazione, specialmente in categorie di pazienti fragili e con possibile compromissione della risposta immunitaria (7).

Se è vero che lo studio della memoria cellulare, delle cellule T, ed anche della immunità innata può integrare i dati della sierologia, è altrettanto vero che queste metodologie sono molto meno standardizzate, meno disponibili per la maggior parte dei laboratori clinici e quindi di più difficile applicazione routinaria, almeno per ora (1).

Si ritiene pertanto di sollecitare le Autorità competenti a livello nazionale e regionale, affinché sia possibile attivare in Centri di riferimento la valutazione degli anticorpi anti-SARS-CoV-2 con metodi validati e ben correlati con l'attività neutralizzante, da utilizzare nella valutazione della risposta immunitaria di soggetti e pazienti fragili (ad esempio, immunocompromessi, in terapia con farmaci immunoregolatori come i trapiantati d'organo, anziani oltre 70 anni) (7).

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda-Ospedale, Università di Padova, Padova, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 13.07.2021

Accettato: 14.07.2021

Pubblicato on-line: 16.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.058

Si raccomanda che i Centri attivino modalità di condivisione dei risultati per armonizzare i criteri interpretativi [ad esempio, unità di misura standardizzata in Binding Activity Unit (BAU), livello di protezione] e utilizzare i risultati in modo appropriato e nel segno della medicina di precisione.

BIBLIOGRAFIA

1. 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;45:87-90.
2. Winter AK, Hegde ST. The important role of serology for COVID-19 control. *Lancet Infect Dis* 2020;20:758-9.
3. Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol*. 2021 Jul 1:1–10. doi: 10.1038/s41577-021-00578-z.
4. Plebani M, Cosma C, Padoan A. SARS-CoV-2 antibody assay after vaccination: one size does not fit all. *Clin Chem Lab Med*. 2021 doi: 10.1515/cclm-2021-0703.
5. Lippi G, Henry BM, Plebani M. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Testing in Recipients of COVID-19 Vaccination: Why, When, and How? *Diagnostics (Basel)*. 2021;11:941.
6. Dolgin E. Quarter-dose of Moderna COVID vaccine still rouses a big immune response. *Nature* 2021 doi: 10.1038/d41586-021-01893-0.
7. Lippi G, Bernardini S, Ciaccio M, et al. Raccomandazioni ad interim di SIBioC per l'analisi sierologica dell'infezione da SARS-CoV-2. *Bichim Clin* 2021;45:91-99.

Analisi dei livelli trascrizionali di ciclina D1 nello studio delle discrasie plasmacellulari: revisione sistematica della letteratura

Alice Nevone, Pasquale Cascino, Maria Girelli, Claudia Scopelliti, Maggie Piscitelli, Margherita Bozzola, Melania Antonietta Sesta, Jessica Ripepi, Paolo Milani, Marco Basset, Giovanni Palladini, Mario Nuvolone
Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Laboratorio di Biochimica Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia

ABSTRACT

Analysis of cyclin D1 mRNA expression levels in plasma cell dyscrasias: a systematic review of published literature.

Overexpression of cyclin D1 (*CCND1*) occurs often in tumoral plasma cells, mainly – but not exclusively – as a result of the presence of the t(11;14) translocation. Of note, *CCND1* mRNA overexpression or the presence of the t(11;14) translocation was shown to impact on the response to anti-plasma cell drugs and influence prognosis, both in patients with multiple myeloma and with immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis. In this study, we performed a systematic revision of published literature on molecular assays to measure *CCND1* transcript levels in plasma cell dyscrasias, in order to describe currently available assays, their technical characteristics and main applications. Relevant scientific articles were search on PubMed as of October 2020 using combinations of appropriate key words. Of 165 unique studies retrieved, 11 articles fulfilled the inclusion criteria and were further analyzed. Overall, 8 different molecular assays were described and characterized. Most of the studies focused on multiple myeloma, with some studies including also MGUS, plasma cell leukemia and/or AL amyloidosis. Assay design, technical validation and field of application of each assay were systematically reviewed. As more knowledge is gained about the impact of *CCND1* expression levels on the biology of tumoral plasma cells and their response to anti-plasma cell drugs, including novel agents specifically targeting t(11;14)-positive clones, molecular assays to quantify *CCND1* expression levels in tumoral plasma cells may become a useful complementation to molecular cytogenetics, towards a precision medicine approach to diagnose and treat plasma cell disorders which is based on laboratory medicine.

Key words: *ciclina D1, traslocazione, discrasia plasmacellulare*

INTRODUZIONE

Ciclina D1 e ciclo cellulare

La ciclina D1, codificata dal gene *CCND1*, è una proteina della famiglia delle cicline e, assieme alla ciclina D2 (codificata da *CCND2*) e alla ciclina D3 (codificata da *CCND3*), partecipa alla regolazione del ciclo cellulare (1). La ciclina D1 è espressa nella maggior parte dei tessuti ad alto tasso proliferativo, mentre risulta poco o per nulla espressa nelle cellule linfoidi B o nelle plasmacellule in condizioni fisiologiche (2-5).

Un delicato equilibrio tra la sintesi, la stabilità e la degradazione delle diverse cicline ne regola la disponibilità e la concentrazione relativa nelle fasi di rispettiva competenza, permettendo la progressione del ciclo cellulare (1).

La deregolazione del gene *CCND1* è un evento comune a diversi tipi di tumore, quali il carcinoma mammario, il carcinoma epatocellulare, il linfoma mantellare e il mieloma multiplo (6). I meccanismi con cui si può verificare questa deregolazione sono molteplici, noti solo in parte e oggetto di intenso studio.

Corrispondenza a: Mario Nuvolone, Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Laboratorio di Biochimica Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia, Viale Golgi 19, 27100 Pavia, Tel 0382-502994, E-mail mario.nuvolone@unipv.it

Ricevuto: 25.11.2020

Revisionato: 07.01.2021

Accettato: 05.02.2021

Publicato on-line: 16.03.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.009

Descriveremo quindi brevemente i meccanismi ad oggi riconosciuti alla base della sovraespressione di ciclina D1 nel contesto delle discrasie plasmacellulari.

Meccanismi di sovraespressione della ciclina D1: la traslocazione (11;14) e l'amplificazione 11q

Il principale meccanismo responsabile della sovraespressione del gene *CCND1* è la traslocazione che coinvolge i cromosomi 11 e 14. In questa traslocazione, i punti di rottura del cromosoma 14 (14q32) cadono all'interno delle regioni di scambio del *locus IGH*, il gene codificante la catena pesante delle immunoglobuline, mentre quelli del cromosoma 11 (11q13) sono sparsi all'interno di una regione di circa 360 kb compresa tra i geni *MYEOV* e *CCND1* (5,7-9). La traslocazione t(11;14) causa, nella maggior parte dei casi, la scissione di due intensificatori (detti *enhancers*) del *locus IGH* su entrambi i cromosomi derivati, con conseguente sovraregolazione del protooncogene *CCND1*.

La traslocazione cromosomica t(11;14)(q13;q32) è l'anomalia citogenetica più comune nelle discrasie plasmacellulari, essendo riportata nel 15-20% dei casi di mieloma multiplo (10-14) e nel 55-60% dei casi di amiloidosi AL (15-17). Quest'ultima percentuale aumenta ad oltre il 70% quando si restringe l'analisi ai casi di amiloidosi AL associati a plasmocitosi midollare inferiore al 10% e concentrazione della componente monoclonale inferiore a 30 g/L (17).

La ciclina D1 può risultare tuttavia sovraregolata anche in cloni plasmacellulari privi della traslocazione t(11;14). Il meccanismo di sovraregolazione di *CCND1* implicato nella maggior parte di questi casi è rappresentato dalla presenza della polisomia del cromosoma 11 (o amplificazione di 11q), con conseguente presenza di copie sovrannumerarie del gene *CCND1* (18). È interessante notare come i cloni mielomatosi con polisomia del cromosoma 11 mostrino tipicamente livelli di espressione della ciclina D1 intermedi rispetto agli alti livelli dei casi recanti la traslocazione t(11;14) e all'espressione trascurabile di altri casi di mieloma o di plasmacellule non clonali (8,18,19).

Nell'amiloidosi AL invece, la sovraespressione di ciclina D1 per amplificazione di 11q è un meccanismo che potrebbe avere un ruolo soltanto marginale, poiché l'iperdiploidia è un fenomeno relativamente raro (11% dei casi) in questa patologia e l'amplificazione di 11q visibile con la ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti su nuclei interfasic (iFISH, dall'inglese *Interphase Fluorescence In Situ Hybridization*) in assenza di t(11;14), è probabilmente riferibile alla presenza di una traslocazione non bilanciata der(11)t(11;14)(q13;q32) (20).

A complicare ulteriormente il quadro, non tutti i cloni mielomatosi con amplificazione 11q esprimono la ciclina D1 (8,19,21,22). Al contrario, esistono rari casi di mieloma multiplo con sovraespressione di ciclina D1 in

assenza di qualsiasi anomalia citogenetica del cromosoma 11, a dimostrazione dell'esistenza di meccanismi alternativi per la sovraespressione di ciclina D1, inclusi meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali (8,19,21-23). Nel complesso, queste osservazioni implicano che le analisi citogenetiche (inclusa la iFISH) non sono in grado di identificare tutti i casi di cloni plasmacellulari sovraesprimenti ciclina D1.

Sulla base di lavori che combinavano analisi citogenetiche atte ad indagare la presenza di traslocazioni che coinvolgono il *locus IGH*, inclusa la traslocazione t(11;14), a studi di espressione dei membri delle cicline di classe D (*CCND1*, *CCND2* e *CCND3*) è stato possibile identificare sottogruppi di casi di mieloma multiplo con profili trascrizionali peculiari, generando la cosiddetta classificazione TC (per Traslocazione e Ciclina D) del mieloma multiplo (24,25). In questo contesto, è interessante rilevare come i casi con sovraespressione della ciclina D1 in presenza o assenza della traslocazione t(11;14) mostrino profili trascrizionali divergenti, con il primo che fa parte del gruppo TC1 e il secondo assegnato principalmente al gruppo TC2 (19,24,25).

Inoltre, una ricerca incentrata sull'analisi dell'espressione genica di campioni di amiloidosi AL e mieloma multiplo ha identificato un set di 12 geni - tra cui *CCND1* - in grado di distinguere tra le due discrasie plasmacellulari con un'accuratezza di classificazione del 92% (26), rilevando inoltre che le plasmacellule amiloidogeniche mostrano un profilo di espressione genica intermedio rispetto alle plasmacellule non clonali e al mieloma multiplo. In questo studio, la comparazione tra il profilo trascrizionale dell'amiloidosi AL e quello del mieloma multiplo ha indicato che i livelli medi di espressione di *CCND1* erano significativamente più alti nell'amiloidosi AL, e questa differenza persisteva anche quando si limitava l'analisi ai casi recanti la t(11;14), verosimilmente in virtù dell'esistenza di differenze intrinseche nel coinvolgimento del gene *CCND1* in queste due condizioni (26).

Correlazione della t(11;14) e della sovraespressione di *CCND1* con la risposta ai farmaci

La presenza di specifiche alterazioni citogenetiche e la sovraespressione di diversi membri delle cicline di classe D hanno implicazioni per la biologia del clone plasmacellulare e le caratteristiche cliniche risultanti (19,24,25). Ad esempio, la traslocazione t(11;14) è frequentemente osservata tra i casi di mieloma multiplo che secernono una componente monoclonale costituita da sole catene leggere libere e tra i rari casi di mieloma multiplo secernente IgM (27-29).

Anche la risposta a terapie specifiche e la sopravvivenza dei pazienti sembrano essere influenzate dallo stato di traslocazione e dal coinvolgimento dei geni delle cicline di classe D, anche se a questo proposito esistono dati contraddittori. Infatti, secondo uno studio (18) la sovraespressione della ciclina D1 valutata mediante reazione a catena della polimerasi quantitativa

con retrotrascrizione (RT-qPCR) si è dimostrata un fattore prognostico favorevole per i pazienti con mieloma multiplo di nuova diagnosi trattati con chemioterapia ad alte dosi e uno o due trapianti di cellule staminali autologhe, essendo associata ad una più lunga remissione e ad una prolungata sopravvivenza senza ricaduta (18).

Tuttavia, la presenza della t(11;14) rilevata con la ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti delle immunoglobuline citoplasmatiche (clgFISH) non correlava con il tempo alla progressione e la sopravvivenza globale dopo trapianto autologo di cellule staminali in altre serie di pazienti con mieloma multiplo (30). Inoltre, alcuni lavori hanno dimostrato che la sovraespressione della ciclina D1 rilevata a livello proteico mediante immunostochimica oppure a livello trascrizionale mediante RT-qPCR è correlata a tassi più elevati di risposta alla terapia di salvataggio con l'inibitore del proteasoma bortezomib in pazienti con mieloma multiplo refrattario recidivante (6,31). Al contrario, un altro studio ha mostrato che la rilevazione immunostochimica dell'espressione della ciclina D1 nelle cellule di mieloma di pazienti di nuova diagnosi trattati con bortezomib o farmaci immunomodulatori è associata a una sopravvivenza globale più breve (32). Sulla stessa linea, una analisi trascrittomiche mediante microarray su cellule CD138+ derivate dal midollo osseo, prelevato alla diagnosi, di pazienti successivamente esposti alla terapia di induzione con bortezomib, talidomide e desametasone ha mostrato che il gene maggiormente sovraespresso nei pazienti che non riuscivano a ottenere una risposta ematologica completa era *CCND1* (33).

Le ragioni alla base delle discrepanze nei diversi studi che indagano l'effetto prognostico della t(11; 14) o della sovraespressione della ciclina D1 in relazione alla risposta a diverse terapie sono attualmente poco conosciute. Diversi lavori hanno iniziato ad affrontare questo aspetto. Nelle linee cellulari di mieloma, è stato dimostrato che l'espressione della ciclina D1 induce una risposta all'accumulo di proteine mal ripiegate e ha un impatto sullo stato redox cellulare e sulla farmacosensibilità (34,35).

In una coorte, i pazienti con amplificazione del gene *CCND1* valutata mediante FISH *locus*-specifiche hanno mostrato all'analisi immunostochimica un'espressione significativamente aumentata della proteina multi-resistente (MDR1) e una sopravvivenza globale e libera da progressione più breve (36).

In uno studio retrospettivo su plasmacellule CD138+ derivate dal midollo osseo di pazienti con amiloidosi AL, la sovraespressione della ciclina D1, misurata mediante RT-qPCR, è stata associata ad una maggiore prevalenza di cloni che secernono una componente monoclonale costituita dalla sola catena leggera libera e ad una minor probabilità di risposta ematologica alla terapia di prima linea (37). La correlazione tra i livelli di ciclina D1 e la presenza della t(11; 14) non è stata possibile poiché in questa serie di casi non sono state eseguite analisi citogenetiche (37).

Alcune recenti ricerche che mettono in correlazione i risultati della citogenetica molecolare con la risposta alla terapia, hanno aumentato l'interesse per la presenza della traslocazione t(11;14) nell'amiloidosi AL. Infatti, la traslocazione t(11;14) è risultata associata a una sopravvivenza globale più lunga nei pazienti trattati con melfalan e desametasone come terapia di prima linea (38). La traslocazione t(11;14) è stata invece associata ad un esito peggiore dopo la terapia a base di bortezomib in due grandi serie indipendenti di pazienti con amiloidosi AL di nuova diagnosi (39,40). Al momento non è noto se la sovraespressione della ciclina D1 nei casi di amiloidosi AL in assenza di traslocazione t(11;14) abbia un effetto prognostico sulla risposta alla terapia.

Alla luce dei dati che indicano la sua maggiore sensibilità rispetto all'immunostochimica (8,23), la RT-qPCR si propone come una metodologia conveniente per valutare la sovraespressione della ciclina D1 nelle discrasie plasmacellulari.

In questo studio, ci proponiamo di descrivere lo stato dell'arte relativo alle metodiche di analisi dei livelli di espressione trascrizionale di *CCND1* nelle discrasie plasmacellulari mediante una revisione sistematica della letteratura inerente.

METODI

Revisione sistematica di lavori scientifici per la quantificazione dei livelli trascrizionali di ciclina D1 in discrasie plasmacellulari

È stata raccolta la letteratura scientifica relativa alle metodiche per la quantificazione dei livelli trascrizionali di ciclina D1 (*CCND1*) nel contesto di studi su discrasie plasmacellulari presente su PubMed all'Ottobre 2020. A tale scopo, è stata usata una combinazione di ciascuna delle parole chiave "Cyclin D1" e/o "t(11;14)", con ciascuna delle parole chiave "RT-PCR", "RT-qPCR", "polymerase chain reaction", "droplet digital PCR", "ddPCR", "digital PCR", "dPCR", "TaqMan" o "Nanostring" e ciascuna delle parole chiave "multiple myeloma", "MM", "AL amyloidosis", "AL", "amyloidosis", "systemic amyloidosis", "MGUS", "monoclonal gammopathy", "plasma cell dyscrasia", "plasma cells". Questa ricerca ha portato a un elenco di 165 studi unici.

Sono stati analizzati tutti gli studi raccolti e sono stati esclusi i lavori non inerenti all'oggetto di studio.

Analisi dei saggi per la quantificazione dei livelli di espressione genica di ciclina D1

Gli studi risultati idonei sono stati analizzati al fine di estrapolare le seguenti informazioni: contesto sperimentale di studio, coorte di pazienti indagata, materiale analizzato, tecnica adottata, geni utilizzati per la normalizzazione, sequenza e coordinate genomiche dei primer e delle eventuali sonde impiegate, validazione tecnica del saggio, metodo di quantificazione dei risultati e validazione con altre analisi, correlazioni dei risultati con osservazioni cliniche.

RISULTATI

Abbiamo eseguito una revisione sistematica della letteratura scientifica incentrata sull'analisi dei livelli trascrizionali di ciclina D1, focalizzandoci su studi condotti su cellule primarie da pazienti affetti da discrasie plasmacellulari. Tale ricerca ha consentito di identificare 165 studi unici, esaminati per verificarne l'aderenza all'oggetto di studio. In conclusione, sono stati identificati 11 studi corrispondenti ai criteri di interesse (Figura 1). Ognuno di questi lavori è stato analizzato per estrapolare le principali caratteristiche dei saggi impiegati (sintetizzate in Tabella 1 e Figura 2) ed è descritto di seguito.

Il primo lavoro incluso nella revisione sistematica risale al 2000, ad opera di Troussard et al. (41). La coorte di pazienti analizzata in questo studio comprendeva 2 pazienti affetti da leucemia plasmacellulare e 12 pazienti con mieloma multiplo alla diagnosi. Impiegando un saggio di RT-PCR pubblicato da Uchimarū et al. nel 1997 (42), è stata rilevata un'espressione di *CCND1* nel 50% dei campioni. In parallelo è stata effettuata l'analisi FISH, che ha mostrato la presenza della traslocazione t(11;14) nel 30% dei casi e di alterazioni a carico del cromosoma 11 nel 20%. Questi dati hanno dimostrato una correlazione tra l'espressione di ciclina D1 e la presenza della t(11;14), suggerendo inoltre che possono essere presenti diversi punti di rottura sul cromosoma 11q13 che non sempre coinvolgono il gene *CCND1*.

Un successivo studio venne condotto nel 2001 da

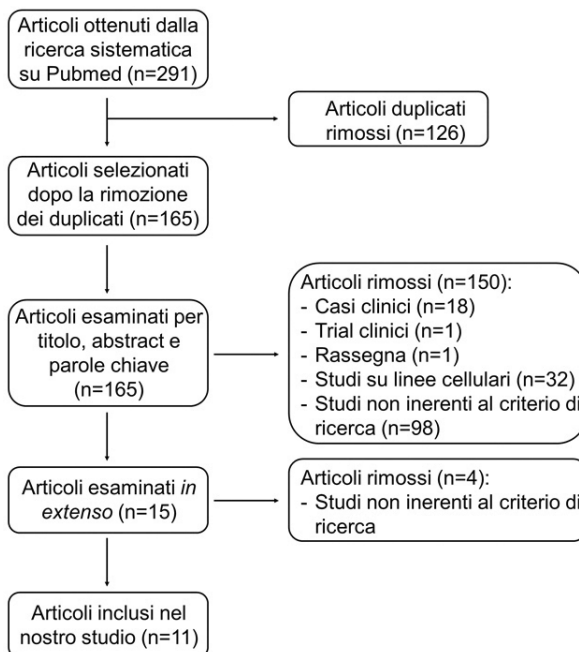


Figura 1

Flusso di lavoro per la ricerca sistematica. Gli studi erano presenti su Pubmed ad Ottobre 2020, e sono stati ricavati con la seguente sequenza di parole chiave: "Cyclin D1" e/o "t(11;14)", con ciascuna delle parole chiave "RT-PCR", "RT-qPCR", "polymerase chain reaction", "droplet digital PCR", "ddPCR", "digital PCR", "dPCR", "TaqMan" o "Nanostring" e ciascuna delle parole chiave "multiple myeloma", "MM", "AL amyloidosis", "AL", "amyloidosis", "systemic amyloidosis", "MGUS", "monoclonal gammopathy", "plasma cell dyscrasia", "plasma cells".

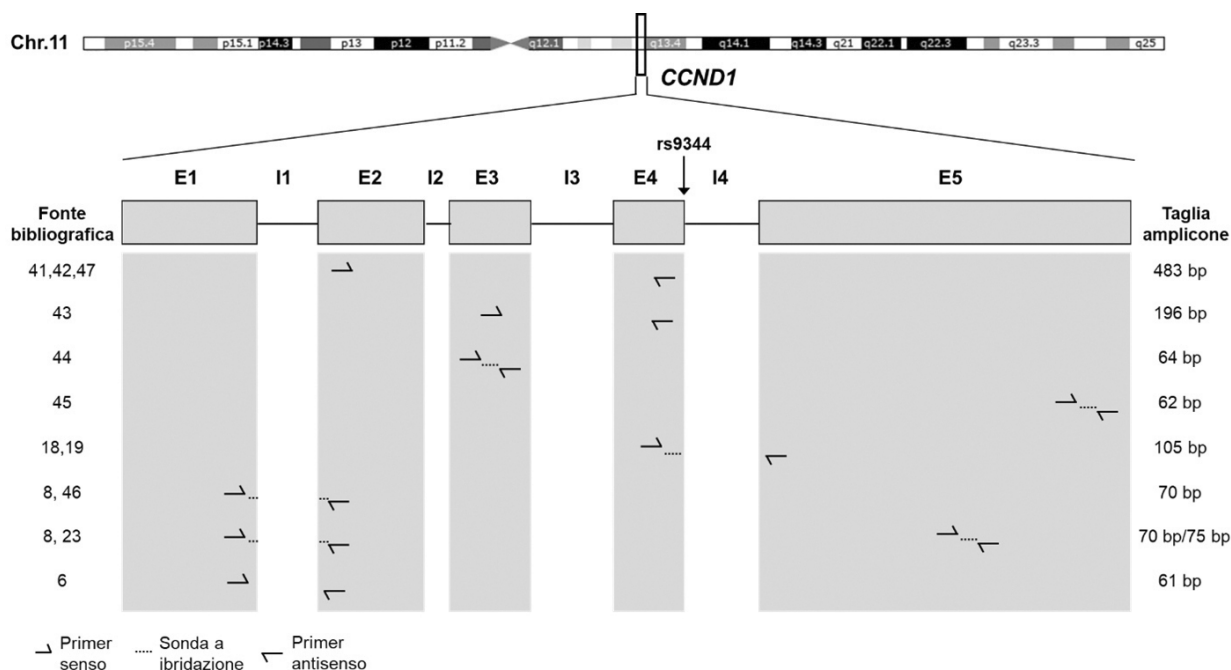


Figura 2

Schema delle coordinate genomiche dei saggi molecolari per lo studio dei livelli trascrizionali di *CCND1*. Schema del cromosoma 11 umano ottenuto da Ensembl. E: esone; I: introne; bp: paia di basi.

Athanasiou et al. su una coorte di 15 pazienti affetti da mieloma multiplo o linfoma mantellare (questi ultimi usati come controlli positivi), i cui livelli di espressione di ciclina D1 sono stati analizzati con RT-PCR (43). Per la normalizzazione del saggio è stato selezionato il

gene *GAPD* (frequentemente indicato come *GAPDH*), codificante la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi. 7 dei 12 pazienti con mieloma multiplo (58%) e tutti i controlli hanno mostrato un'amplificazione di *CCND1*. L'analisi della ciclina D1 è stata comparativamente

Tabella 1

Caratteristiche principali degli 11 studi analizzati.

| Publicazione | Campioni analizzati | Diagnosi | Tipologia di campione | Tipologia di saggio | Gene | Oligonucleotide senso (5'-3') | Oligonucleotide antisenso (5'-3') | Sonda (5'-3') |
|-------------------------------------|---------------------|--|----------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Troussard X et al, 2000 (41) | 14 | 12 MM 2 PCL | Cellule mononucleate | RT-PCR | <i>CCND1</i> | CTGGCCATGAACTACCTGGA | GTCACACTTGATCACTCTGG | - |
| Athanasiou et al, 2001 (43) | 15 | 12 MM 3 MCL | Aspirato midollare congelato | RT-PCR | <i>CCND1</i> | AACAGATCATCCGCAAACAC | TCACACTTGATCACTCTGGA | - |
| Rasmussen et al, 2001 (44) | 120 | 110 MM 10 donatori | Cellule mononucleate | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | GCTGCTCCTGGTGAACAAGC | TTCATGAAATCGTGCGGG | CAAGTGGAACTGGCCCAATGA |
| | | | | | <i>GAPDH</i> | Test commerciale | Test commerciale | Test commerciale |
| Rasmussen et al, 2003 (45) | 96 | 40 MGUS 40 MM 9 ExMM 7 donatori | Plasma cellule | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | TGGGTCTGTGCATTCTGGTT | ACATGCCGGTTACATGTTGGT | CACCCGGGCGCTTCCAG |
| | | | | | <i>ACTB</i> | CCTTTTGTCCCCAACTTGA | TGGCTGCCTCCACCCA | ATGTAT-GAAGGCTTTTGGTCTCCCTGGGA |
| Soverini et al, 2003 (18) | 84 | 74 MM 10 donatori | Cellule mononucleate | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | ACCTGAGGAGCCCCAACAA | TCTGCTCCTGGCAGGCC | TCCTACTACCGCCTCA-CACGCTTCCTC |
| | | | | | <i>ABL</i> | TCCTCCAGCTGTATCTGGAAGA | TGGTCCAGCGAGAAGGTT | CCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCT-CAGGG |
| Katayama Y et al, 2004 (47) | 40 | 34 MM 4 MGUS 2 PCL | Plasma cellule | RT-PCR | <i>CCND1</i> | CTGGCCATGAACTACCTGGA | GTCACACTTGATCACTCTGG | - |
| Specht et al, 2004 (8) | 48 | MM | Cellule tumorali da tessuti FFPE | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | CCGTCCATGCCGAAGATC | CCTCCTCCTCGCACTTCTGT | CTCGCAGACCTCCAGCATCCAGGT |
| | | | | | <i>TBP</i> | GCCCGAAACGCCGAATAT | CCGTGGTTCGTGGCTCTCT | ATCCCAAGCGGTTTGTGCGGG |
| Agnelli et al, 2005 (19) | 54 | 50 MM 4 donatori | Plasma cellule | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | ACCTGAGGAGCCCCAACAA | TCTGCTCCTGGCAGGCC | TCCTACTACCGCCTCACACGCTTCT |
| | | | | | <i>GAPDH</i> | Test commerciale | Test commerciale | Test commerciale |
| J.Slotta-Huspenina et al, 2008 (23) | 59 | 59 MM | Cellule tumorali da tessuti FFPE | RT-qPCR | <i>CCND1 total</i> | CCGTCCATGCCGAAGATC | CCTCCTCCTCGCACTTCTGT | CTCGCAGACCTCCAGCATCCAGGT |
| | | | | | <i>CCND1 3' UTR</i> | TTTTCTACCCAAACGGCCCT | TGAAGAAGAACACAAAC-CAAGTAGCT | CAGCTCAGCTCCAGGTTCACACCA |
| | | | | | <i>TBP</i> | GCCCGAAACGCCGAATAT | CCG TGGTTCGTGGCTCTCT | ATCCCAAGCGGTTTGTGCGGG |
| Ngo et al, 2010 (6) | 51 | 47 rMM 4 donatori | Cellule mononucleate | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | GAAGATCGTCCCACTG | GACCTCCTCCTCGCACTTCT | Test commerciale |
| | | | | | <i>GAPDH</i> | Test commerciale | Test commerciale | Test commerciale |
| Zhou et al, 2012 (37) | 53 | 53 AL | Plasma cellule | RT-qPCR | <i>CCND1</i> | Test commerciale | Test commerciale | Test commerciale |
| | | | | | <i>RPLP0</i> | Test commerciale | Test commerciale | Test commerciale |

MM: mieloma multiplo; PCL: leucemia plasmacellulare; MCL: linfoma mantellare; MGUS: gammopatia monoclonale di significato incerto; ExMM: mieloma multiplo con manifestazione extra midollare; rMM: mieloma multiplo refrattario/recidivato; AL: amiloidosi; FFPE: fissato in formalina e incluso in paraffina; RT-PCR: reazione a catena della polimerasi con retrotrascrizione; RT-qPCR: reazione a catena della polimerasi quantitativa con retrotrascrizione in tempo reale.

condotta sia a livello trascrizionale che proteico, rispettivamente con ibridazione *in situ* (ISH) e analisi immunoistochimiche, sui campioni di midollo fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). I dati di RT-PCR sono risultati concordi con l'ISH nell'83% dei casi e con le analisi immunoistochimiche nel 57%, verosimilmente per una minore sensibilità della immunoistochimica e/o per l'esistenza di una discrepanza tra livelli di trascritti e livelli proteici alla luce di meccanismi di controllo post-trascrizionali.

Nello stesso anno, Rasmussen et al. hanno studiato i livelli di ciclina D1 in una coorte di 110 pazienti con mieloma multiplo e 10 donatori (44). A tale scopo è stato messo a punto un saggio RT-qPCR in tempo reale con il quale sono state analizzate le cellule mononucleate estratte dai campioni di sangue midollare, amplificando sia una porzione dell'esone 3 del gene *CCND1*, sia di *GAPD*, adoperato come controllo interno per la normalizzazione (Figura 2). Sono state effettuate analisi di sensibilità del saggio, dimostrando una linearità di amplificazione di *CCND1* e *GAPD* in un intervallo dinamico di 4 ordini di grandezza di diluizione del cDNA. È stato scelto di effettuare una quantificazione relativa del livello di espressione di *CCND1* con il metodo di comparazione del C_t (o ΔC_t) metodo che prevede di normalizzare i livelli di espressione genica ottenuti sottraendo al C_t medio del gene target il C_t medio del gene normalizzante, al fine di ridurre la variabilità intra-analitica. Sottraendo il C_t del gene normalizzante *GAPD* a quello di *CCND1*, è stato riscontrato un significativo aumento dell'espressione di *CCND1* nel 42% dei casi (46/110) rispetto ai donatori.

Due anni dopo, Rasmussen et al. hanno impiegato un diverso saggio di RT-qPCR in tempo reale per studiare 96 campioni di pazienti affetti da mieloma multiplo o gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS) e donatori (45). In questo saggio, è stato scelto a scopo di normalizzazione *ACTB*, gene codificante per la proteina actina beta, il cui numero di trascritti è stato utilizzato per la formulazione di una curva standard con cui è stata quantificata l'espressione di *CCND1* previa amplificazione di una porzione dell'esone 5 (Figura 2). L'analisi è stata condotta su plasmacellule ottenute per "sorting" citofluorimetrico da campioni di sangue midollare. La sovraespressione di ciclina D1 è stata documentata nel 20% dei pazienti MGUS, nel 30% dei pazienti affetti da mieloma multiplo e nel 56% dei mielomi con manifestazioni extramidollari.

Un'altra estesa coorte di pazienti con mieloma multiplo di cui è stata studiata l'espressione di *CCND1* è quella analizzata da Soverini et al. nel 2003 (18). Lo studio è stato condotto sulle cellule mononucleate estratte dai campioni di sangue midollare di 74 pazienti e di 10 donatori. Nel saggio di RT-qPCR in tempo reale impiegato, l'espressione di *CCND1* è stata normalizzata con il gene *ABL* e quantificata con il metodo $\Delta\Delta C_t$; questo metodo comparativo prevede la sottrazione tra il ΔC_t del campione incognito preso in esame (ottenuto come descritto precedentemente, C_t target - C_t normalizzante), con il ΔC_t di un campione scelto come

calibratore interno. In questo studio la linea di mieloma multiplo KMS-12 è stata impiegata come calibratore interno. È stata inoltre effettuata una robusta validazione del saggio. Per valutare l'efficienza dell'amplificazione sono state utilizzate 5 diverse quantità di RNA (1, 5, 10, 50 e 100 ng) come input della reazione, validando l'approccio del $\Delta\Delta C_t$, mentre la sensibilità è stata investigata diluendo due linee cellulari in due campioni di RNA di donatori sani, in 4 diluizioni seriali che hanno mostrato un decremento lineare del valore di $\Delta\Delta C_t$ e un coefficiente di variazione (CV) di 0,96-0,98. La riproducibilità è stata verificata analizzando dieci replicati dello stesso campione in una singola analisi (CV=0,07) e lo stesso campione in test effettuati in 10 giorni diversi (CV=0,06). Questo saggio ha permesso di misurare la sovraespressione di ciclina D1 nel 43% dei pazienti.

Inoltre, per 32/74 pazienti sono state condotte con successo delle analisi di citogenetica convenzionale e/o FISH. Nel 56% dei casi sono state riscontrate delle anomalie a carico del cromosoma 11q, con 9 pazienti risultati positivi per la traslocazione (11;14) e 9 pazienti con una copia aggiuntiva del cromosoma. Questi casi mostravano livelli di espressione di *CCND1* più elevati rispetto ai campioni privi di anomalie e ai campioni sani, tra i quali non vi erano differenze di espressione. I pazienti positivi per la t(11;14) mostravano inoltre livelli di espressione genica di *CCND1* più elevati rispetto ai pazienti recanti copie sovranumerarie del cromosoma 11q. In questo studio è stata riportata una durata della remissione dopo terapia significativamente maggiore nei pazienti sovraespressanti ciclina D1.

L'anno successivo Specht et al. (8) hanno analizzato 48 pazienti con mieloma multiplo impiegando un saggio di RT-qPCR in tempo reale ideato e validato dallo stesso gruppo nel 2002 (46). In questo saggio, i livelli relativi di ciclina D1 di ciascun campione sono stati ottenuti dividendo il numero di copie di *CCND1* per quello di *TBP*, scelto come gene normalizzante, mentre per i valori soglia necessari per indicare i tre gruppi di espressione di ciclina D1 (alta, intermedia o bassa/non rilevabile) è stato deciso di impiegare i valori medi del rapporto *CCND1:TBP*. Laddove possibile, i risultati dello studio dell'espressione di ciclina D1 sono stati correlati ad analisi di immunoistochimica e citogenetica molecolare (FISH). Il 23% dei pazienti ha mostrato un'elevata espressione di *CCND1*, sia a livello trascrizionale che proteico, e la presenza della t(11;14). Un'espressione di ciclina D1 bassa o intermedia è stata invece riscontrata nel 31% dei pazienti, con una buona correlazione tra i dati di RT-qPCR e immunoistochimici (sebbene quest'ultimi fossero meno sensibili), in concomitanza con la presenza di amplificazione 11q nella quasi totalità di questi pazienti. Il rimanente 46% dei pazienti ha mostrato una espressione bassa o non rilevabile della ciclina D1 a livello trascrizionale e proteico, in assenza di traslocazione t(11;14) o anomalie del *locus* 11q13. La correlazione tra alti livelli di ciclina D1 a livello trascrizionale e proteico e la presenza della t(11;14) è stata ulteriormente confermata

anche in questa casistica, sebbene emerga ancora una piccola percentuale di casi sovraespressi di ciclina D1 riconducibili a meccanismi diversi da anomalie del cromosoma 11q o dalla presenza della $t(11;14)(q13;q32)$, che in questo studio è indicata come un fattore ad esito relativamente favorevole per pazienti affetti da mieloma multiplo.

Sempre nel 2004, Katayama et al. hanno analizzato una coorte di 40 pazienti affetti da mieloma multiplo, MGUS o leucemia plasmacellulare (47). Anche in questo caso, il saggio impiegato per l'analisi delle cellule mononucleate di sangue midollare è lo stesso descritto da Uchimaru et al. (42), mentre per la quantificazione relativa dei livelli di espressione è stata utilizzata la formula descritta da Taniguchi et al. (48) che consiste nel rapporto tra la densità del prodotto di PCR di un dato gene e la densità del prodotto di PCR degli altri geni analizzati nel saggio (in questo caso *CCND2* e *CCND3*). L'espressione di *CCND1* è stata rilevata in 17 pazienti (42,5%), 8 dei quali hanno mostrato livelli di espressione elevati. Katayama et al. hanno inoltre effettuato una indagine parallela analizzando 20 campioni con alta o bassa espressione di *CCND1* mediante un microarray, al fine di studiare eventuali differenze nel profilo di espressione genica di questi due gruppi. Nei campioni sovraespressi sono stati identificati due geni meno espressi, *CCND2* e *CD9* (rispettivamente nel 100% e 80% dei pazienti), ma il significato di tale differenza non è stato ulteriormente indagato. I risultati dello studio trascrizionale sono stati comparati con i dati ottenuti dall'analisi citogenetica FISH, riscontrando la $t(11;14)$ e copie sovranumerarie del gene in 7 pazienti sovraespressi *CCND1* e in 3 pazienti con bassi livelli di espressione, dimostrando che la sovraespressione di *CCND1* può essere dovuta a meccanismi aggiuntivi oltre alla $t(11;14)$ e a copie sovranumerarie del gene.

Basandosi sulla classificazione "TC" proposta da Hideshima et al. nel 2004 (25), il gruppo di Agnelli ha effettuato un'analisi del profilo di espressione genico di 50 pazienti e 4 controlli, successivamente validata con un saggio RT-qPCR [lo stesso impiegato da Soverini (18)] e analisi citogenetiche al fine di effettuare una caratterizzazione molecolare alle classi TC proposte (19). Il saggio, effettuato su plasmacellule immunopurificate da campioni di sangue midollare, ha indagato l'espressione di *CCND1*, *CCND2* e *CCND3* e del gene normalizzante *GAPD*, calcolando la quantità dei trascritti di ognuno di questi geni mediante l'uso di una curva standard creata da linee cellulari di mieloma multiplo. La sovraespressione del gene *CCND1* è stata confermata solo se il valore di *CCND1* di un dato campione superava il valore medio di espressione del gene nei campioni di controllo, maggiorato di 3 deviazioni standard. In seguito a questo studio è stato verificato che la classe TC1, di cui fanno parte il 22% dei pazienti studiati, è caratterizzata dalla sovraespressione del gene *CCND1* in presenza della $t(11;14)$, mentre la classe TC2 (22%) presenta una espressione intermedia/bassa di *CCND1* insieme ad amplificazione

11q, non mostrando espressione di *CCND2* o *CCND3* e traslocazioni note.

In linea con recenti scoperte effettuate sul linfoma mantellare circa il ruolo di una particolare isoforma della ciclina D1, mancante della regione non tradotta al 3' ($\Delta 3'$ UTR, *UnTranslated Region*), nel 2008, Slotta-Huspenina et al. hanno ideato un saggio per studiare nel mieloma multiplo il possibile ruolo di questa variante, che nel linfoma mantellare è associata ad alti livelli di mRNA di *CCND1*, aumentato tasso proliferativo e una prognosi infausta (23). A tale scopo, partendo dal saggio già pubblicato da Specht et al. (8,46), è stata inserita l'analisi dell'espressione di questa variante su una coorte comprendente 59 pazienti con mieloma multiplo con alta o bassa/nessuna espressione di ciclina D1. In parallelo, sono stati effettuati esami citogenetici e immunoistochimici e sulla base dei risultati ottenuti sono stati identificati due gruppi di pazienti. Il primo gruppo (17 pazienti) ha mostrato una forte correlazione tra analisi trascrizionali, citogenetiche e immunoistochimiche: tutti i pazienti presentavano alti livelli di mRNA di *CCND1*, alta espressione di ciclina a livello proteico, presenza della $t(11;14)$ e in 9 casi su 17 anche amplificazione 11q. Nel secondo gruppo si è invece rilevata un'espressione debole o moderata di ciclina D1 a livello trascrizionale e proteico, e 20 casi su 23 hanno mostrato amplificazione 11q in assenza di traslocazione (11;14). In questo contesto, è stato dimostrato che l'espressione della ciclina $\Delta 3'$ UTR è indipendente dalla presenza della $t(11;14)$, alla luce della paragonabile percentuale di questo trascritto tra i pazienti recanti la $t(11;14)$ (63% dei casi) e i pazienti che ne sono privi (50%). Inoltre, la ciclina $\Delta 3'$ UTR è risultata non influente sulla sopravvivenza o sul tasso di proliferazione. Anche in questa casistica si confermano l'alta espressione di *CCND1* in casi recanti la traslocazione, e una espressione intermedia del gene nei cloni recanti l'amplificazione 11q.

La coorte indagata da Ngo et al. comprende 47 pazienti con mieloma multiplo recidivante/refrattario trattati con bortezomib, e 4 donatori (6). Il saggio di RT-qPCR ideato in questo studio, previa validazione tecnica di cui non vengono forniti particolari dettagli, è stato impiegato per l'amplificazione dei geni delle cicline di tipo D e del gene normalizzante *GAPD* nelle cellule mononucleate ottenute da campioni di midollo osseo, usando il metodo della comparazione del C, per la quantificazione dei livelli di ciclina. Il 45% dei pazienti ha mostrato un'alta espressione di *CCND1*, sebbene variabile tra i diversi campioni. Al fine di valutare al meglio la correlazione tra l'espressione di ciclina D1 e la risposta alla terapia con bortezomib, i pazienti sono stati divisi in 3 gruppi. Il primo gruppo, caratterizzato da alti livelli di *CCND1*, era composto da 4 pazienti in risposta parziale dopo trattamento con bortezomib. Il secondo gruppo, identificato da un livello intermedio di espressione di *CCND1*, comprendeva 5 pazienti, dei quali 1 ha raggiunto la risposta completa, 1 ha ottenuto una risposta parziale, 1 ha raggiunto una risposta minima, mentre 2 hanno mantenuto una malattia stabile.

Infine, il terzo gruppo, costituito da 11 pazienti con livelli di espressione bassi o negativi, ha raggiunto in 5 casi una risposta parziale, mentre 3 casi hanno avuto una malattia stabile e 3 pazienti una progressione della malattia. Il numero limitato di pazienti non ha consentito di definire alcuna correlazione statisticamente rilevante, sebbene sia stata registrata una sopravvivenza più lunga e senza progressione della malattia nei pazienti sovraespressanti ciclina D1.

L'ultimo saggio identificato dall'analisi sistematica è quello pubblicato da Zhou et al. nel 2012, e focalizzato sullo studio dell'amiloidosi AL (37). Per validare una contestuale analisi del profilo di espressione genica di pazienti con amiloidosi AL, in questo lavoro i livelli di espressione plasmacellulare di *CCND1* di 53 pazienti sono stati esaminati con un saggio commerciale per RT-qPCR. Il gene *RPLP0* è stato selezionato per la normalizzazione sulla base dei risultati del microarray effettuato, in cui tale gene risultava maggiormente stabile rispetto a *GAPD*. Durante la fase di validazione tecnica del saggio, sono state verificate: l'accuratezza, impiegando sei concentrazioni crescenti di cDNA della linea cellulare KMS12-BM e valutando la soglia di rilevazione (C_t); la sensibilità, effettuando 6 diluizioni di KMS12-BM nel midollo di un donatore sano e valutando l'espressione relativa di *CCND1* in funzione della percentuale di KMS12-BM presente; la riproducibilità, misurando il C_t di 20 o più campioni in due diversi giorni. Sono stati quindi analizzati i livelli di espressione dei campioni presi in esame, definendo come sovraespressanti i campioni il cui valore superasse l'espressione media relativa di 5 campioni usati come controllo, maggiorato di due deviazioni standard. Così facendo sono stati identificati 33 pazienti (62%) con alti livelli di *CCND1*, e 20 pazienti (38%) con livelli inferiori al valore soglia. In questo studio sono state effettuate alcune correlazioni cliniche, da cui è risultato che i pazienti con amiloidosi AL sovraespressanti ciclina D1 presentavano più frequentemente cloni produttori la sola catena leggera, avevano una minore risposta alla terapia iniziale e una sopravvivenza globale inferiore rispetto al gruppo di pazienti con espressione di *CCND1* bassa o non rilevabile.

Recentemente è stato dimostrato che la presenza di polimorfismi di singoli nucleotidi o di altri mismatch di sequenza tra primer e template può ridurre la prestazione di saggi di RT-qPCR (49), con un effetto deleterio dipendente dal numero e dalla posizione dei mismatch stessi, con interferenza maggiore nel caso di mismatch nelle ultime cinque posizioni al terminale 3' dell'oligonucleotide (49). Abbiamo quindi investigato la frequenza con la quale i primer impiegati per l'amplificazione del gene *CCND1* presentavano mismatch di sequenza rispetto a mutazioni e polimorfismi noti sulla base dei portali Ensembl e dbSNPs, indagando in caso di mismatch la loro posizione all'interno dell'oligonucleotide (Tabella 1). Solo in 2 studi (41,47) che impiegavano lo stesso saggio (42), i primer indagati corrispondevano ad una regione genomica priva di mutazioni o polimorfismi noti. In altri

due casi (8,23) veniva impiegato un saggio in cui mismatch di sequenza erano presenti nella sonda a ibridazione ma non nei primer. Negli altri 6 studi mismatch di sequenza erano presenti sia nei primer che nelle sonde a ibridazione. In un caso è stato impiegato un saggio commerciale (37).

In media, erano presenti 7 mismatch per primer (intervallo: 1-19) e 19 primer (66%) presentavano mismatch nelle ultime 5 posizioni in 3'.

DISCUSSIONE

Il ruolo della sovraespressione della ciclina D1, conseguente alla traslocazione t(11;14) o ad altri meccanismi molecolari, nella patogenesi delle discrasie plasmacellulari e il suo effetto sulla biologia del clone plasmacellulare e sulla sua risposta a diversi farmaci plasmacellulari, merita di essere approfondito.

In questo contesto, le indagini trascrizionali per la quantificazione dei livelli di espressione genica di *CCND1* potrebbero rappresentare un'utile complemento alle indagini citogenetiche per lo studio della traslocazione t(11;14) e dell'amplificazione del locus *CCND1* e/o della regione 11q, nonché delle indagini immunostochimiche per gli studi di espressione proteica della ciclina D1.

Indagini molecolari di questo tipo sono gravate da una serie di difficoltà procedurali legate ad aspetti pratici, tecnici e biologici, con notevoli ricadute specie sulla variabilità pre-analitica. Il materiale di partenza per tali indagini, sia esso il sangue midollare o la biopsia osteomidollare, richiede infatti un prelievo relativamente invasivo e passibile di problemi di esecuzione, come la diluizione con sangue periferico nel caso del mieloaspirato. Inoltre, il sangue midollare prelevato è generalmente impiegato per una serie di analisi (valutazione citomorfologica, indagini immunofenotipiche, indagini citogenetiche classiche e molecolari) per cui il materiale disponibile per le indagini molecolari è solitamente limitato. In aggiunta, la purificazione delle cellule mononucleate e, ancor più, delle plasmacellule midollari, richiede il ricorso ad una serie di procedure laboriose (centrifugazione su gradiente di densità, eventualmente immunopurificazione o "sorting" citofluorimetrico) con rese in termini di purezza della frazione cellulare separata tipicamente inferiori al 100%. Inoltre, le indagini trascrizionali richiedono per necessità l'analisi dell'RNA e pertanto sono maggiormente sensibili a problemi di conservazione e degradazione del campione. Tale problema è ulteriormente acuito nel caso della biopsia osteomidollare, in cui il tessuto è frequentemente sottoposto a fissazione con formalina e inclusione in paraffina. Infine, le indagini trascrizionali richiedono spesso il ricorso a geni di riferimento la cui espressione dovrebbe essere stabile nella coorte dei campioni esaminati e servire per scopi di normalizzazione delle quantità di espressione del/i gene/i in esame.

In questo studio abbiamo analizzato la letteratura biomedica allo scopo di identificare i saggi molecolari

utilizzati per la misurazione dei livelli trascrizionali di *CCND1* nel comparto midollare/emopoietico di pazienti con discrasie plasmacellulari. A seguito della revisione sistematica effettuata, abbiamo identificato 11 studi rispondenti ai criteri di ricerca, che abbiamo quindi esaminato in dettaglio.

Il mieloma multiplo è risultato essere la discrasia plasmacellulare prevalentemente indagata, essendo l'oggetto di studio in 10 lavori su 11, con pazienti inclusi alla diagnosi in tutti i casi, tranne uno in cui sono stati analizzati pazienti con mieloma multiplo refrattario/recidivante (6). Oltre a pazienti con mieloma multiplo, la *coorte* di pazienti indagata ha incluso anche pazienti con MGUS (45,47) e leucemia plasmacellulare (41,47) in due casi ciascuno. L'unico studio non focalizzato sul mieloma multiplo ha preso in esame una *coorte* di pazienti affetta da amiloidosi AL (37).

I campioni analizzati sono stati ottenuti dalle cellule mononucleate dal sangue midollare o da plasmacellule purificate (per immunoseparazione o per "sorting" citofluorimetrico a flusso) in 4 studi ciascuno, da cellule tumorali separate da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) in 2 studi e da midollo osseo congelato in un altro studio.

Tranne 3 casi (41,43,47), tutti i lavori analizzati hanno utilizzato sonde a ibridazione, al fine di aumentare la specificità di riconoscimento del gene *CCND1* e del gene normalizzante scelto. In merito all'uso dei geni normalizzanti, tutti i saggi che ne hanno fatto uso (8/11) hanno impiegato un solo gene ai fini della normalizzazione. I livelli di espressione di *CCND1* sono stati normalizzati rispetto ai livelli di *GAPD* in 3 studi, ai livelli di *TBP* in 2 studi e rispetto ai livelli di *ACTB*, *ABL1* o *RPLP0* in uno studio ciascuno. La logica alla base della selezione di un gene specifico per scopi di normalizzazione è stata chiarita solo nello studio in cui è stato impiegato *RPLP0* (37).

Per quanto concerne gli oligonucleotidi e le sonde impiegate, uno studio ha utilizzato un saggio commerciale sia per *CCND1* che per il gene normalizzante, mentre altri tre studi hanno utilizzato saggi commerciali per il gene normalizzante, ma non per *CCND1*. Cinque dei saggi non commerciali per *CCND1* sono basati su saggi di RT-qPCR precedenti pubblicati dello stesso gruppo di ricerca o da altro gruppo, mentre per gli altri 5 lavori il disegno del saggio è del tutto originale.

Dei saggi non commerciali esaminati, in tutti gli studi, tranne due (44,45), sono stati impiegati primer e/o sonde di ibridazione diretti contro esoni diversi o a cavallo di due esoni, al fine di minimizzare la possibilità di una amplificazione spuria di DNA genomico eventualmente co-purificato al momento dell'estrazione dell'RNA (Figura 2).

Abbiamo quindi investigato la frequenza con la quale gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del gene *CCND1* presentavano mismatch di sequenza rispetto a mutazioni e polimorfismi noti. Il rationale di questa analisi deriva da un recente studio di Lefever et al. che ha dimostrato l'effetto deleterio di mismatch di sequenza

tra oligonucleotidi impiegati nell'ambito della PCR e la molecola di DNA target, in base al loro numero e posizione all'interno dell'oligonucleotide, in considerazione dell'elevato numero di polimorfismi noti (in media 1 SNP per 58 bp nell'intero genoma, in media 1 SNP per 20 bp nell'esoma, in base alla versione dbSNP 137) (49). In questo contesto, si segnala la SNP rs9344, presente nel gene *CCND1*, alla luce della sua frequenza relativamente elevata nella popolazione generale e della sua associazione con mieloma multiplo e amiloidosi AL (50,51). Sebbene nessuno dei saggi presi in esame impieghi oligonucleotidi che mappano nella regione di *CCND1* in cui si colloca la SNP rs9344 (al confine tra l'esone 4 e 5), l'81% degli studi indagati presenta comunque potenziali mismatch nelle ultime cinque posizioni al terminale 3' di uno degli oligonucleotidi o della sonda inclusi nel saggio, risultando dunque passibile ad amplificazioni subottimali nel caso di pazienti portatori di una SNP nella regione del gene *CCND1* interessata.

Da un punto di vista di validazione tecnica del saggio impiegato, in 3 studi viene descritta in modo dettagliato la convalida tecnica del saggio di RT-qPCR impiegato e vengono riportati dati di sensibilità, l'accuratezza e la riproducibilità del saggio (18,37,44). In un quarto saggio viene fatta menzione di una validazione tecnica della quale non vengono forniti ulteriori dettagli (6). Altri 3 lavori utilizzano saggi precedentemente ideati e pubblicati dallo stesso gruppo di lavoro e pertanto la validazione non è stata ripetuta (8,19,23). I rimanenti 4 studi non fanno cenno a validazioni tecniche pur impiegando saggi descritti per la prima volta.

La comparazione dei dati ottenuti dall'analisi trascrizionale effettuata con RT-qPCR con dati ottenuti da analisi proteiche o indagini citogenetiche è stata effettuata rispettivamente in 3 e 5 studi, ottenendo in ogni caso una elevata correlazione tra i risultati ottenuti dalle indagini trascrizionali e quelli ottenuti con le analisi proteiche o citogenetiche. In questo contesto, l'analisi RT-qPCR ha dimostrato una maggiore sensibilità rispetto alle indagini immunostochimiche. Inoltre, negli studi in cui i dati trascrizionali sono stati comparati ai dati citogenetici, è stato dimostrato che la traslocazione (11;14) si associa ad elevati livelli di espressione della ciclina D1, mentre l'amplificazione 11q a livelli di espressione intermedi tra quelli elevati risultanti dalla presenza della t(11;14) e i livelli bassi o non rilevabili nelle plasmacellule normali o prive di aberrazioni a carico del cromosoma 11. Da questi studi sono comunque emersi dei casi di sovraespressione di ciclina D1 in assenza di t(11;14) e viceversa casi in cui la traslocazione non si associa ad una sovraespressione del gene *CCND1*. I meccanismi molecolari alla base della sovraespressione di *CCND1* in assenza di t(11;14) o altre anomalie del cromosoma 11 sono attualmente oggetto di studio e appaiono di particolare interesse alla luce del possibile impatto prognostico della traslocazione (11;14) o della sovraregolazione di *CCND1* sulla risposta a determinati farmaci anti-plasmacellulari. Infatti, sono state recentemente identificate correlazioni

tra la sovraespressione di *CCND1* e/o la presenza della traslocazione (11;14) con la risposta a specifici trattamenti farmacologici, come la già citata risposta inferiore ad una terapia di prima linea con bortezomib, sia nei pazienti con mieloma multiplo, sia nei pazienti con amiloidosi AL (32,33).

In questo contesto, sarà particolarmente importante effettuare studi che riportino i dati di monitoraggio, compresi i tassi di risposta dopo il trattamento con regimi specifici e dati di sopravvivenza, per i pazienti con dati di presenza/assenza di t(11;14) su base IFISH e per i quali siano stati misurati i livelli trascrizionali di *CCND1*. Tale paradigma sperimentale sarà essenziale per valutare il possibile impatto prognostico delle misurazioni dei livelli trascrizionali di *CCND1* nelle discrasie plasmacellulari e un possibile valore additivo di questo tipo di analisi rispetto alla citogenetica molecolare.

Recentemente, un nuovo inibitore selettivo di BCL-2, il venetoclax, è stato accolto come la prima terapia mirata contro il mieloma multiplo (52-54). Questo farmaco induce l'apoptosi nelle cellule di mieloma multiplo, in particolare nei cloni positivi alla traslocazione (11;14), che esprimono alti livelli del fattore anti-apoptotico BCL-2. Nei pazienti con mieloma multiplo refrattario recidivante trattati con venetoclax, la risposta ematologica è stata osservata nel 21% dei pazienti. Questa cifra aumenta al 40% tra i pazienti con mieloma positivi alla t(11;14), con risposte ematologiche profonde e durature (53). Considerata la maggiore prevalenza di cloni plasmacellulari positivi a t(11;14) rilevati nell'amiloidosi AL, il venetoclax potrebbe avere un impatto significativo anche sul trattamento di questa condizione, anche se allo stato attuale l'esperienza clinica nell'impiego di venetoclax per il trattamento dell'amiloidosi AL è limitata (55-59). Sarà interessante appurare se BCL-2 sia sovraregolato nei cloni plasmacellulari che sovraesprimono *CCND1* indipendentemente dalla presenza della traslocazione (11;14) e se il venetoclax dimostri un effetto terapeutico contro questi cloni. In tal caso, la potenziale utilità clinica dei saggi molecolari che quantificano in modo affidabile i livelli di *CCND1* nei tumori plasmacellulari, eventualmente accoppiati a saggi per quantificare i livelli di espressione di *BCL2*, sarebbe ulteriormente rafforzata e si inserirebbe a pieno titolo nel contesto di una medicina di precisione basata sulla medicina di laboratorio.

CONFLITTO DI INTERESSI

Questo lavoro è stato in parte supportato da un finanziamento della Fondazione CARIPLO per il progetto "*Harnessing the plasma cell secretory capacity against systemic light chain amyloidosis*" (n. 2018-0257), e da un finanziamento del Ministero della Salute per il progetto "*Towards effective, patient-tailored anti-plasma cell therapies in AL amyloidosis: Predicting drug response and overcoming drug resistance*" (GR-2018-12368387) (M.N).

BIBLIOGRAFIA

1. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-31.
2. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, et al. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88:674-81.
3. Raynaud SD, Bekri S, Leroux D, et al. Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies. *Genes, Chromosomes Cancer* 1993;8:80-7.
4. Ronchetti D, Finelli P, Richeida R, et al. Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma. *Blood* 1999;93:1330-7.
5. Vaandrager JW, Kluin P, Schuurung E. The t(11;14) (q13;q32) in multiple myeloma cell line KMS12 has its 11q13 breakpoint 330 kb centromeric from the cyclin D1 gene. *Blood* 1997;89:349-50.
6. Ngo BT-T, Felthaus J, Hein M, et al. Monitoring bortezomib therapy in multiple myeloma: screening of cyclin D1, D2, and D3 via reliable real-time polymerase chain reaction and association with clinico-pathological features and outcome. *Leuk Lymphoma* 2010;51:1632-42.
7. Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, et al. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, *myeov*, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 2000;95:2691-8.
8. Specht K, Haralambieva E, Bink K, et al. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 2004;104:1120-6.
9. Vaandrager JW, Schuurung E, Zwikstra E, et al. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996;88:1177-82.
10. Avet-Loiseau H, Li JY, Facon T, et al. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 1998;58:5640-5.
11. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, et al. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985;66:380-90.
12. Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, et al. The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. *Blood* 1997;90:526-34.
13. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, et al. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;82:41-9.
14. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 1998;12:960-9.
15. Hayman SR, Bailey RJ, Jalal SM, et al. Translocations involving the immunoglobulin heavy-chain locus are possible early genetic events in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2001;98:2266-8.
16. Bochtler T, Hegenbart U, Heiss C, et al. Hyperdiploidy is less frequent in AL amyloidosis compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance and inversely associated with translocation t(11;14). *Blood* 2011;117:3809-15.

17. Bochtler T, Merz M, Hielscher T, et al. Cytogenetic intraclonal heterogeneity of plasma cell dyscrasia in AL amyloidosis as compared with multiple myeloma. *Blood Adv* 2018;2:2607-18.
18. Soverini S, Cavo M, Cellini C, et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 2003;102:1588-94.
19. Agnelli L, Bicciato S, Mattioli M, et al. Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J Clin Oncol* 2005;23:7296-306.
20. Granzow M, Hegenbart U, Hinderhofer K, et al. Novel recurrent chromosomal aberrations detected in clonal plasma cells of light chain amyloidosis patients show potential adverse prognostic effect: first results from a genome-wide copy number array analysis. *Haematologica* 2017;102:1281-90.
21. Guglielmelli T, Giugliano E, Cappia S, et al. Frequency and distribution of trisomy 11 in multiple myeloma patients: relation with overexpression of CCND1 and t(11;14). *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173:51-6.
22. Prunerì G, Alietti A, Agnelli L, et al. Immunoreactivity for cyclin D1 is a reliable marker of gene aberration in plasma cell myeloma but does not specify patients prognosis. *Leuk Res* 2008;32:1628-32.
23. Slotta-Huspenina J, Koch I, Richter M, et al. Cyclin D1 positive multiple myeloma: predominance of the short, 3'UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14) translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions. *Leuk Res* 2008;32:79-88.
24. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:296-303.
25. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, et al. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-18.
26. Abraham RS, Ballman KV, Dispenzieri A, et al. Functional gene expression analysis of clonal plasma cells identifies a unique molecular profile for light chain amyloidosis. *Blood* 2005;105:794-803.
27. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:6333-8.
28. Feyler S, O'Connor SJ, Rawstron AC, et al. IgM myeloma: a rare entity characterized by a CD20-CD56-CD117-immunophenotype and the t(11;14). *Br J Haematol* 2008;140:547-51.
29. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-21.
30. Gertz MA. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005;106:2837-40.
31. Dawson MA, Opat SS, Taouk Y, et al. Clinical and immunohistochemical features associated with a response to bortezomib in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2009;15:714-22.
32. Tasidou A, Roussou M, Terpos E, et al. Increased expression of cyclin-D1 on trephine bone marrow biopsies independently predicts for shorter overall survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *Am J Hematol* 2012;87:734-6.
33. Terragna C, Remondini D, Martello M, et al. The genetic and genomic background of multiple myeloma patients achieving complete response after induction therapy with bortezomib, thalidomide and dexamethasone (VTD). *Oncotarget* 2016;7:9666-79.
34. Bustany S, Bourgeois J, Tchakarska G, et al. Cyclin D1 unbalances the redox status controlling cell adhesion, migration, and drug resistance in myeloma cells. *Oncotarget* 2016;7:45214-24.
35. Bustany S, Cahu J, Guardiola P, et al. Cyclin D1 sensitizes myeloma cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating the unfolded protein response pathway. *BMC cancer* 2015;15:262.
36. Sewify EM, Afifi OA, Mosad E, et al. Cyclin D1 amplification in multiple myeloma is associated with multidrug resistance expression. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14:215-22.
37. Zhou P, Hoffman J, Landau H, et al. Clonal plasma cell pathophysiology and clinical features of disease are linked to clonal plasma cell expression of cyclin D1 in systemic light-chain amyloidosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012;12:49-58.
38. Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, et al. Gain of chromosome 1q21 is an independent adverse prognostic factor in light chain amyloidosis patients treated with melphalan/dexamethasone. *Amyloid* 2014;21:9-17.
39. Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, et al. Translocation t(11;14) is associated with adverse outcome in patients with newly diagnosed AL amyloidosis when treated with bortezomib-based regimens. *J Clin Oncol* 2015;33:1371-8.
40. Muchtar E, Dispenzieri A, Kumar SK, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization in untreated AL amyloidosis has an independent prognostic impact by abnormality type and treatment category. *Leukemia* 2017;31:1562-9.
41. Troussard X, Avet-Loiseau H, Macro M, et al. Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. *Hematol J* 2000;1:181-5.
42. Uchimarū K, Taniguchi T, Yoshikawa M, et al. Detection of cyclin D1 (bcl-1, PRAD1) overexpression by a simple competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay in t(11;14)(q13;q32)-bearing B-cell malignancies and/or mantle cell lymphoma. *Blood* 1997;89:965-74.
43. Athanasiou E, Kaloutsis V, Kotoula V, et al. Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2001;116:535-42.
44. Rasmussen T, Knudsen LM, Johnsen HE. Frequency and prognostic relevance of cyclin D1 dysregulation in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2001;67:296-301.
45. Rasmussen T, Theilgaard-Monch K, Hudlebusch HR, et al. Occurrence of dysregulated oncogenes in primary plasma cells representing consecutive stages of myeloma pathogenesis: indications for different disease entities. *Br J Haematol* 2003;123:253-62.
46. Specht K, Kremer M, Muller U, et al. Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections. *Clin Cancer Res* 2002;8:2902-11.
47. Katayama Y, Sakai A, Okikawa Y, et al. Cyclin D1 overexpression is not a specific grouping marker, but may collaborate with CDC37 in myeloma cells. *Int J Oncol* 2004;25:579-95.
48. Taniguchi T, Fujita A, Takahashi S, et al. Cyclin D1 overexpression detected by a simple competitive reverse

- transcription-polymerase chain reaction assay for lymphoid malignancies. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:159-66.
49. Lefever S, Pattyn F, Hellemans J, et al. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. *Clin Chem* 2013;59:1470-80.
 50. da Silva Filho MI, Forsti A, Weinhold N, et al. Genome-wide association study of immunoglobulin light chain amyloidosis in three patient cohorts: comparison with myeloma. *Leukemia* 2017;31:1735-42.
 51. Weinhold N, Johnson DC, Chubb D, et al. The CCND1 c.870G>A polymorphism is a risk factor for t(11;14)(q13;q32) multiple myeloma. *Nature genetics* 2013;45:522-5.
 52. Kortum KM, Einsele H. First targeted therapy in multiple myeloma. *Blood* 2017;130:2359-60.
 53. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* 2017;130:2401-9.
 54. Moreau P, Chanan-Khan A, Roberts AW, et al. Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood* 2017;130:2392-400.
 55. Leung N, Thome SD, Dispenzieri A. Venetoclax induced a complete response in a patient with immunoglobulin light chain amyloidosis plateaued on cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone. *Haematologica* 2018;103:e135-e7.
 56. Sidiqi MH, Al Saleh AS, Leung N, et al. Venetoclax for the treatment of translocation (11;14) AL amyloidosis. *Blood Cancer J* 2020;10:55.
 57. Yip PL, Lau JSM, Lam CP. Venetoclax monotherapy induced rapid and sustained response in a frail patient with refractory AL amyloidosis: Less is more? *Internat J Hematol* 2020;112:234-7.
 58. Gran C, Borg Bruchfeld J, Ellin F, et al. Rapid complete response to single-agent Bcl-2 inhibitor venetoclax in a heart-transplanted patient with triple refractory immunoglobulin light-chain amyloidosis. *Acta Haematol* 2020;143:500-3.
 59. Ghilardi G, Stussi G, Mazzucchelli L, et al. Venetoclax plus daratumumab induce hematological CR and organ response in an AL amyloidosis patient with t(11;14). *Amyloid* 2019;26:173-4.

Evaluation of the antiproliferative effect of *Bifidobacterium longum* BB-536 in solid tumor cell lines, co-cultured with murine splenocytes

Lorella Tripodi^{1,2}, Margherita Passariello¹, Valeria D'Argenio^{1,3}, Eleonora Leggiero¹, Maria Vitale^{1,4}, Roberta Colicchio⁴, Paola Salvatore^{1,4}, Vincenzo Cerullo^{4,5}, Claudia De Lorenzo^{1,4}, Lucio Pastore^{1,4}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli

²Scuola Europea di Medicina Molecolare (SEMM), Naples site

³Dipartimento di Promozione delle Scienze Umane e della Qualità della Vita, Università Telematica San Raffaele, Roma

⁴Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

⁵Laboratory of Immunovirotherapy, Drug Research Program, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, Finland

ABSTRACT

Introduction: in the last decade, cancer immunotherapy has delivered impressive results in clinical settings. However, its efficacy has not been consistent probably because of several environmental and genetic factors influencing the outcome. Many studies have indicated that intestinal microbiota could affect the outcome of immune checkpoint inhibitors-based immunotherapy, both in animal models and patients. In particular, the *Bifidobacterium* genus seems to have a role as a positive regulator of *in vivo* antitumor immunity by promoting proinflammatory signals in innate immune cells. According to the considerable evidence that demonstrated its crucial role in the carcinogenesis and, overall, in the response to immunotherapy, we decided to use a commercial probiotic and grow its principal strain, the *Bifidobacterium longum* BB-536, in order to test its capability to affect antitumoral immune responses.

Methods: prior to *in vivo* studies, we carried out a feasibility evaluation study to test *in vitro*, antitumoral effects of the isolated probiotic strain. Tumor cell viability was used as parameter to determine *Bifidobacterium longum* BB-536 anti-proliferative ability before or after heat inactivation.

Results: interestingly, we found that *B. longum* inhibits cell growth, both in mouse melanoma B16-OVA and colorectal CT26 cells, showing a more pronounced effect on the latter ones.

Conclusion: this preliminary evaluation of live and heat-inactivated probiotic in tumor cell lines indicates a potential cell growth inhibitory effect of these bacterial strains and encourage further studies in mouse models.

Keywords: microbiome, immunotherapy, cancer

INTRODUCTION

Cancer immunotherapy has currently achieved impressive results in treating solid tumors, prompting research efforts in this field; in particular, immunotherapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs), which target immunomodulatory molecules on the surface of T cells, or their ligands, is capable to significantly enhance anti-tumor immune responses. Despite the enthusiasm for ICIs response in different tumor types, a significant proportion of patients does not experience consistent and long-lasting responses. Tremendous efforts have

focused on identifying predictors of immune checkpoint blockade response and strategies to overcome this therapeutic resistance (1); several studies suggest that intestinal microbiota has a significant role in modulating responses to these therapies, offering a reliable explanation of variability in clinical outcomes (2-4). These findings have identified the microbiome profile of patients who best respond to the immunotherapies, often identified as responder (R), identifying the genera of commensal bacteria that have shown immunomodulatory properties and antitumoral effects in different ways (5).

Corrispondenza a: Lucio Pastore, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, e CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Via G. Salvatore 486, 80145 Napoli, Tel +39-081-3737885, E-mail lucio.pastore@unina.it

Ricevuto: 21.01.2021

Revisionato: 10.03.2021

Accettato: 23.03.2021

Pubblicato on-line: 22.04.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.021

More recently, a different type of immunotherapy based on oncolytic viruses have produced interesting results and continue to be a promising strategy for developing novel anti-cancer therapies (6). Oncolytic viruses (OVs) are self-replicating, tumor-selective viruses, able to lyse cancer cells directly. They can be engineered to provide tumor selectivity or induce a significant immune response by inserting different immune-stimulating genes, such as cytokines or tumor peptides (7,8). One of the advantages of using OVs is their capability to modulate the tumor microenvironment (TME), rendering it less immunosuppressive (9,10). The ability to selectively kill tumor cells is not the primary mechanism of action of OVs: in fact, after intra-tumoral delivery, these viruses are able to recruit lymphocytes in the tumor environment and induce a response also toward tumor-associated antigens (TAA) reducing the highly immunosuppressive characteristics of the tumor milieu. After the infection of cancer cells, OVs trigger an inflammatory reaction because they can induce a particular form of apoptosis, better known as immunogenic cell death (ICD). During this process, OV-mediated cancer cell lysis leads to the release of TAAs into the microenvironment allowing the immune system to recognize them and to generate a response, breaking down the immuno-editing process (11). The TME in which the OVs trigger an ICD is not a homogenous mass of neoplastic cells. However, it includes non-transformed cells like innate and adaptive immune cells, mesenchymal stem cells, surrounding blood vessels, proteins of the extracellular matrix, and signaling molecules, such as cytokines and chemokines. Nonmalignant cells in the TME support cancer growth, exerting a dynamic tumor-promoting function at all carcinogenesis stages. Communication between cell types is driven by a complex network of cytokines, chemokines, growth factors, other inflammatory mediators, and matrix remodeling enzymes (12).

Recent evidence has indicated a connection between microbiome, immune system, and tumorigenesis (13). Microbiome modulates inflammation and immune system response also maintaining a healthy barrier and producing bacterial metabolites with different features that induce local and systemic effects influencing the host response to the tumor. Intestinal microbiota accompanies us throughout our lifespan and exert several functions crucial for our physiology (14,15). In contrast, intestinal dysbiosis has been linked to an increasing number of diseases (16), including tumorigenesis both local (gastrointestinal cancers) and in distant sites of the body (17). Intestinal microbiota has been shown to modulate immunotherapy with ICIs, both in mouse models and in humans. *Bacteroides fragilis* was reported to enhance anti-Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) efficacy by a mechanism that involves the activation of Th1 cells with cross-reactivity to bacterial antigens and tumor neoantigens (3,18). Oral administration of *Bifidobacterium* exerted a double effect, increased tumor infiltration and IFN- γ production by CD8+ tumor-specific T cells, and also improved tumor

control and anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) efficacy, inducing an increased activation of intratumoral dendritic cells (DCs) (3). The efficacy of CTLA-4 blockade in epithelial tumor patients is influenced by the microbiota composition (*B. fragilis* and/or *B. thetaiotaomicron* and *Burkholderiales*), demonstrating a pivotal role for *Bacteroidales* in the immunostimulatory effects of CTLA-4 blockade (18). The studies in mice established the importance of the microbiome in cancer ICB therapy and inspired clinical pursuits to assess the microbiome's impact on anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1-based therapies in patients. Exciting results were published by Matson et al. that, accomplishing the metagenomic analysis of fecal samples from patients with melanoma treated with immune checkpoint inhibitors, found that responders had a different microbiome profile, compared to not-responders. These Authors identified and functionally proved *in vivo* the role played by *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, and *Collinsella aerofaciens* in ameliorating anti-PD-L1 efficacy (19). Consistently with these findings, many studies have been aimed at modifying the intestinal microbiota of non-responder patients to increase immunotherapy efficacy. Several clinical trials are combining the traditional anticancer therapies, such as surgical resections, chemotherapy, and/or radiotherapy, with the supplementation of probiotics, as reported by Vivarelli et al. (20). Other papers have highlighted the anti-tumor effect of probiotics that mix different strains belonging to the genera *Bifidobacterium* [21] and *Lactobacillus* (22). *Bifidobacterium longum* belongs to *Bifidobacterium* genera, within the phylum Actinobacteria; it has been shown to have a synergistic interaction with human immune cells and to modulate specific pathways, involving innate and adaptive immune processes (21). Many evidences support the idea that *Bifidobacteria* exert their beneficial effects on host health through some of their surface-associated molecules (23,24). Considering the shaping ability of the tumor microenvironment exerted by the microbiome and the positive effects of the supplementation with probiotics, we focused our study on the antiproliferative properties of the *Bifidobacterium longum* strain BB-536 against tumor cell lines. We chose two rich immunogenic mouse tumor models: B16-OVA, a melanoma cell line and CT26, a colorectal cell line (25). Considering that *Bifidobacterium longum* is a gram-positive, non-pathogenic and non-toxicogenic probiotic bacterium that does not contain any plasmid and does not display harmful metabolic activities (26), we compared its antiproliferative properties against cancer cells, with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, as pathogenic and opportunistic bacteria, respectively a gram positive and a gram negative bacteria. We also made a comparison of the antiproliferative effects of *Bifidobacterium longum* strain BB-536 to the immune cell-death mediated by the oncolytic adenovirus Ad5D24 (7). In order to reproduce a microenvironment where the cell communication occurs via soluble factors, we set-up a co-culture system by using a multi-

compartment approach (trans-well plates) with tumor cells, naïve murine splenocytes in the absence or presence of the following treatments: *Bifidobacterium longum* strain BB-536, oncolytic adenovirus Ad5D24 and control bacteria. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

In this study, we provide a preliminary evaluation of the antiproliferative properties of *Bifidobacterium longum* strain BB-536 in *in vitro* tumor models. These preliminary data provide a strong rationale for carrying out further studies in mouse tumor models, combining the cancer immunovirotherapy with the supplementation of *Bifidobacterium longum* or a mix of *Bifidobacterium* spp.

METHODS

Cell lines culture

The B16-OVA, a mouse melanoma cell line expressing chicken ovalbumin (OVA), and the CT.26, a mouse colon adenocarcinoma cell line were used. Both cell lines were cultured according to American Type Culture Collection (ATCC) recommendations. The cells were cultured in RPMI-1640 high glucose medium and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotics, and 1% of L-Glutamine. The A549, a human lung carcinoma cell line, was provided from the cell bank facility in CEINGE-Biotecnologie Avanzate (Napoli, Italy). All the cells were grown at 37°C, 5% CO₂ in a 95% humidified atmosphere air.

Bacterial growth conditions and preparation of bacterial treatment on cells

The *Bifidobacterium longum* BB-536 strain was isolated from the probiotic Bifido GI Balance (01622 Life Extension). The anaerobic culture of the bacteria was performed in 2.5 L AnaeroJar (Thermo-fisher OXOID) at 37°C, using Difco™ Man Rogosa & Sharpe (MRS) broth (Becton-Dickinson) supplemented with 0.25% cysteine-HCl (Sigma Aldrich, Italia) (MRS-C) and Schaedler agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood (Becton-Dickinson). *Escherichia coli* ATCC 13762 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were used as a control in the co-culture experiments. They were heat-inactivated at 65°C for 30 minutes before the addition of cell cultures.

Amplification and purification of Ad5D24 oncolytic virus

Ad5D24 amplification was carried out by infecting A549 cells at 70-80% confluence at 10 multiplicity of infection (MOI). After 72 hours, before the occurrence of cytopathic effect (CPE), cell pellet was collected and stored at -80°C.

Subsequently, the pellet underwent three freeze-thaw cycles and then centrifuged at 4 000 rpm for 25 min at 25°C; then supernatant was collected and vector purified by ultracentrifugation at 27 000 rpm for 1-2 h at

4°C on a CsCl gradient. The band containing the oncolytic virus was subjected to a further ultracentrifugation step under the same conditions described above, for a time exceeding 18 h. Once isolated, the sample was dialyzed in TM solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂) for 2 h under stirring at 4°C. The vector was then dialyzed in freezing solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 4% sucrose) overnight at 4 °C. Vector was collected, aliquoted, and stored at -80°C. Ad5D24 was titrated by spectrophotometric reading.

Animal experiments

Animal studies were performed in accordance with National Institute of Health guidelines and in accordance with ethical and safety rules and guidelines for the use in biomedical research provided by the relevant Italian laws and European Union's directives (n° 331/2019-PR). All efforts were made to minimize the animal suffering. We used 10-12 weeks old female C57BL/6J mice for spleen collection. Spleen were collected directly after mice sacrifice. Splenocytes were isolated by straining mashed spleen through a 70-µm cell strainer into a freezing medium containing 10% FBS and 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) in six-well plates. Finally, single-cell suspension of splenocytes were frozen at -80° C. For experimental procedures, splenocytes were thawed, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and collected by centrifugation at 1 200 rpm for 10 min at 25°C. The pellets were resuspended in 1 mL of R10, represented by RPMI culture medium supplemented with 10% inactivated FBS, 1% L-glutamine, 1% pen/strep, 1% HEPES (Gibco TM, Thermo Fisher Scientific), and 1:1 000 β-mercaptoethanol.

Effects of *Bifidobacterium longum* on co-cultures of tumor cells and splenocytes

The co-culture assays of mouse B16-OVA and splenocytes (1:10 ratio) or mouse CT.26 and splenocytes (1:10 ratio) in the absence or presence of *Bifidobacterium longum* were performed to evaluate its *in vitro* anticancer effects on cell viability. On day 0, 3,000 cells (B16-OVA or CT.26) per well were plated in triplicate in a 96-well plate and incubated at 37°C for 16 hours. Murine splenocytes were then added in a tenfold excess with respect to tumor cells (B16-OVA and CT.26). *Bifidobacterium longum* was added to the cells at a final concentration of 105 CFU/mL. Considering that *Bifidobacterium longum* is a gram-positive, non-pathogenic bacterial strain, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were used as controls and added to the cells at a final concentration of 105 CFU/mL. Ad5D24 was added to the cells at a concentration of 100 MOI. After 48 h of co-culture, the supernatants were harvested and stored at -20°C while the adherent cells to the well plate surface, were detached and counted. Cells counts were evaluated by using an Automated Cell Counter Invitrogen™ (Invitrogen). Cell viability was assessed by trypan blue staining.

RESULTS

***Bifidobacterium longum* BB-536 shows anti-proliferative effects on murine melanoma cells**

In melanoma patients treated with cancer immunotherapies, such as ICIs or oncolytic adenoviruses, probiotic supplements can be useful if bacteria exert immunomodulatory activities leading to a reduction of cancer cell proliferation. To test this hypothesis, we used the syngeneic B16-OVA mouse melanoma cells expressing the xeno-antigen ovalbumin, widely used in cancer and immunological studies, to evaluate the effects of the probiotic on tumor cells, used alone, and on the activation of immune cells against cancer cells in co-cultures of tumor cells with splenocytes. All bacteria used in the co-culture experiments were heat inactivated as reported in the section of material and methods. In a first experiment, tumor cells were treated with heat-inactivated *Bifidobacterium longum* or control bacterial strains for 48 hours. As shown in Figure 1, all the three inactivated bacterial strains including *Bifidobacterium longum* BB-536 (105 CFU/mL) affect cell growth showing a viability of 92% and 78% for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and 69% for the probiotic. In parallel assays, Ad5D24 tested in the same conditions inhibited the cell viability of about 60%. When the experiments were repeated in the presence of splenocytes, we observed a stronger reduction of cell viability, likely due the activation of immune cells against cancer cells. Specifically, we observed statistically significant differences between the treatment with *Bifidobacterium longum* BB-536 (69% of cell viability) compared to

untreated co-cultures with splenocytes (75% of viable cells) as indicated in Figure 1. On the other hand, splenocytes pulsed with *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* were markedly activated against B16-OVA cells; this result was expected with both control strains used as opportunistic pathogens. Although murine melanoma cells are not permissive for Ad5D24 replication, splenocytes pulsed with this vector increased the cell death of tumor cells of about 20%.

***Bifidobacterium longum* BB-536 antiproliferative effects on murine colorectal carcinoma cells**

CT26, a mouse colon cell line, shows a high immunogenicity (T-lymphocyte infiltration in tumors) and is responsive to immunotherapy such as CTLA-4 inhibitor treatment, in mouse models. To test the effects of *Bifidobacterium longum* BB-536 on the proliferation of CT26 cells, we incubated the tumor cells for 48 hours with each of the three bacterial strains, as indicated above (Figure 2). As shown in Figure 2, colorectal carcinoma cells show a reduction of cell proliferation after treatment with *Bifidobacterium longum* BB-536 (105 CFU/ml) similar to that observed with control bacterial strains. Infection with oncolytic adenovirus Ad5D24, carried out in parallel assays, did not significantly affect cells proliferation (92% of cell viability).

When the experiments were repeated in presence of splenocytes, a stronger reduction of cell viability was observed, likely due the activation of immune cells against cancer cells. We observed statistically significant differences between the treatment with *Bifidobacterium*

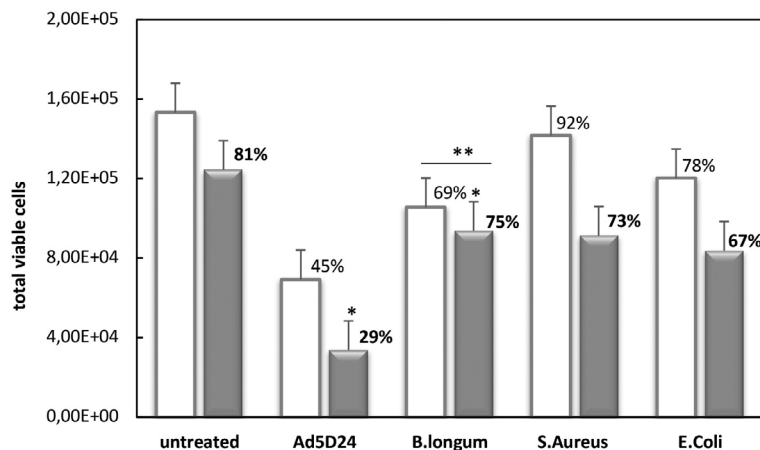


Figura 1

Evaluation of the anti-proliferative effect of *Bifidobacterium longum* BB-536 on B16-OVA cells.

The B16-OVA cells were incubated in absence (white bar) or presence (grey bar) of mouse splenocytes isolated from the spleens of naïve mice and treated with *Bifidobacterium longum* BB-536 for 48 hours. Cell viability is reported as the percentage of viable cells compared to untreated cells and for cells treated with Ad5D24 or bacteria in presence of splenocytes, the percentage of viable cells was compared to untreated cells -pulsed splenocytes (indicated in bold number). Splenocytes pulsed with either *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* towards cancer cells showed a cell viability, similar to cells treated with *Bifidobacterium longum*. The experiments were performed in triplicate and statistical significance was examined by the Student's t-test. The asterisks indicate statistical significance (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$) compared to untreated cells. The vertical lines indicate the standard error (SE).

longum BB-536 (inhibition of cell viability of about 62%) compared to untreated co-cultures with splenocytes (inhibition of cell viability of about 10%) as indicated in Figure 2. On the other hand, splenocytes pulsed with *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* were surprisingly not active against CT26 cells. Although the murine colorectal cells are not a permissive cell line for the replication of Ad5D24, Ad-pulsed splenocytes increased the percentage of cell death (45% of cell viability) compared to cells infected by Ad5D24 in the absence of splenocytes. We observed that *Bifidobacterium longum* BB-536-pulsed splenocytes were more effective in killing colorectal carcinoma cells (36% of vitality) compared to melanoma cells.

DISCUSSION

In the past decade, immunotherapy aimed at blocking the interactions between the immune checkpoint receptors and their ligands (e.g., PD-1 and PD-L1/2) has completely revolutionized the way cancer is treated in some cases and changed patients' life expectancy (27). It has become evident that CD8+ T lymphocytes presence at patients' baseline is a critical parameter, necessary but not sufficient, to predict patients' positive overall response (27,28). Unfortunately, the effects on tumor regression do not occur and are long-lasting in all patients probably because of environmental and genetic factors.

The intestinal microbiota, a perfect ecosystem of communities of bacteria (and viruses and fungi) that shows greater complexity than the human genome itself, has been recently evaluated in a number of clinical

settings. The intestinal microbiota has essential functions, such as developing immunity, defense against pathogens, and host nutrition, including the production of short-chain fatty acids essential in host energy metabolism. More recently, the role of microbiota in carcinogenesis and in the overall response to immunotherapy has been demonstrated; therefore, we decided to investigate the antitumoral properties of *Bifidobacterium longum* on two murine tumor cells. Specifically, we used a commercial probiotic and grow its principal strain, the *Bifidobacterium longum* BB-536, to test its effect in co-culture system with tumor cells and murine naïve splenocytes.

We carried out a feasibility evaluation study to test *in vitro* antitumoral effects of the isolated heat-inactivated probiotic strain, by using two different tumor cell lines: B16-OVA and CT26. Interestingly, we found that *Bifidobacterium longum*, even when inactivated was able to affect cell viability, both in B16-OVA and in CT26 cells. In presence of splenocytes, we observed an increased effect probably due to an immune stimulatory effect exerted by *Bifidobacterium longum* BB-536 (Figure 2). In addition, Ad-pulsed splenocytes, used in parallel assays, were also active against cancer cells, probably due to their activation mediated by the virus.

These results allow to extend our investigation in other tumor cell lines poorly immunogenic, confirming the immunomodulatory and anti-proliferative power of *Bifidobacterium longum*. Additionally, we think that to sought combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death *in vitro* could be interesting, considering that both oncolytic virus and *Bifidobacterium longum* have shown an immunomodulatory and anti-

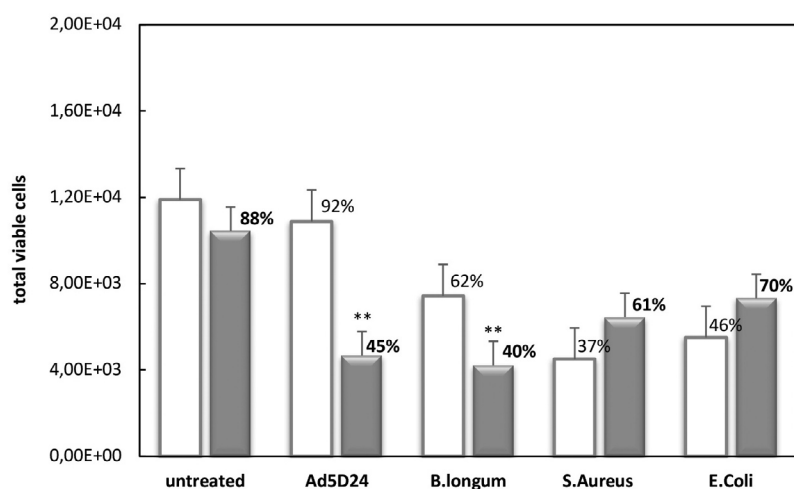


Figura 2

Evaluation of the anti-proliferative effect of *B. longum* BB-536 on CT.26 cells.

The CT.26 cells were incubated in absence (white bar) or presence (grey bar) of mouse splenocytes isolated from the spleens of naïve mice and treated with *Bifidobacterium longum* BB-536 for 48 hours. Cell viability is reported as the percentage of viable cells compared to untreated cells and for cells treated with Ad5D24 or bacteria in presence of splenocytes, the percentage of viable cells was compared to untreated cells-pulsed splenocytes (indicated in bold number). Splenocytes pulsed with either *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* towards cancer cells showed a cell viability, higher than cells treated with *Bifidobacterium longum*. The experiments were performed in triplicate and statistical significance was examined by the Student's *t*-test. The asterisks indicate statistical significance (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$) compared to untreated cells. The vertical lines bars indicate the standard error (SE).

proliferative activity in tumor cells. Even though we observed a decrease of viability in tumor cell lines after treatment with heat-inactivated *Bifidobacterium longum*, we plan to substantiate our findings in this *in vitro* model with further evaluations *in vivo*.

However, these preliminary findings provide an encouraging proof-of-concept to move towards further investigations aimed to deeply define the role of *Bifidobacterium longum* administration as a co-adjuvant in immunotherapy for cancer treatment. In order to further evaluate the role of intestinal microbiota in the response to immunovirotherapy, we will perform additional studies in *in vivo* mouse cancer models. Evaluation of intracellular T-cells cytokine production and modulation of different lymphocytes population, such as T-, B- and NK-cells, in mice treated with the combined treatment will help us to assess a possible synergistic anti-tumoral activity of oncolytic virus Ad5D24 together with *Bifidobacterium longum* or other bacteria.

Moreover, the method described herein is an inexpensive approach for evaluating the pro/antiproliferative effect of specific bacterial strains of interest in tumor cell lines. Thus, it may represent a fast and cost-effective procedure to evaluate antitumoral activities of bacterial strains on a plethora of cell lines.

ACKNOWLEDGMENT

Prof. Paola Salvatore kindly provided the bacteria used for the *in vitro* experiments.

CONFLICT OF INTERST

None.

REFERENCES

- Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Brit J Cancer* 2017;117:1-7.
- Fessler J, Matson V, Gajewski TF. Exploring the emerging role of the microbiome in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2019;7:108.
- Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015;350:1084-9.
- Vetizou M, Trinchieri G. Anti-PD1 in the wonder-gut-land. *Cell Res* 2018;28:263-4.
- Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, et al. Microbiome and anticancer immunosurveillance. *Cell* 2016;165:276-87.
- Feola S, Capasso C, Fusciello M, et al. Oncolytic vaccines increase the response to PD-L1 blockade in immunogenic and poorly immunogenic tumors. *Oncoimmunology* 2018;1:32.
- Cerullo V, Capasso C, Vaha-Koskela M, et al. Cancer-targeted oncolytic adenoviruses for modulation of the immune system. *Curr Cancer Drug Targets* 2018;18:124-38.
- Capasso C, Hirvinen M, Garofalo M, et al. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma. *Oncoimmunology* 2015;5:e1105429.
- Parato KA, Senger D, Forsyth PAJ, et al. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 2005;5:965-76.
- de Matos AL, Franco LS, McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: The dynamic duo. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020;17:349-58.
- Ylösmäki E, Malorzo C, Capasso C, et al. Personalized cancer vaccine platform for clinically relevant oncolytic enveloped viruses. *Mol Ther* 2018;26:2315-25.
- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:5591-6.
- Zitvogel L, Daillère R, Roberti MP, et al. Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:465-78.
- D'Argenio V. Human microbiome acquisition and bioinformatic challenges in metagenomic studies. *Int J Mol Sci* 2018;19:383.
- D'Argenio V. The prenatal microbiome: a new player for human health. *High-throughput* 2018;7:38.
- Scudiero O, Pero R, Ranieri A, et al. Childhood obesity: an overview of laboratory medicine, exercise and microbiome. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1385-406.
- Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J Pathology* 2018;244:667-76.
- Vetizou M, Pitt JM, Daillère R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015;350:1079-84.
- Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018;359:104-8.
- Vivarelli S, Falzone L, Basile M, et al. Benefits of using probiotics as adjuvants in anticancer therapy (Review). *World Acad Sci J* 2019;1:125-135.
- Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, et al. *Bifidobacteria* and their molecular communication with the immune system. *Front Microbiol* 2017;8:2345.
- Abidin-Do A, Taherian-Esfahani Z, Ghafouri-Fard S, et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: emphasis on their effects on cancer cells. *Immunotherapy* 2015;7:1307-29.
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, et al. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:696-702.
- Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol-gastr L* 2008;295:G1025-34.
- Zhong W, Myers JS, Wang F, et al. Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. *BMC Genomics* 2020;21:2.
- Xiao J, Takahashi S, Nishimoto M, et al. Distribution of In Vitro Fermentation Ability of Lacto-N-Biose I, a Major Building Block of Human Milk Oligosaccharides, in *Bifidobacterial* Strains. *Appl Environ Microb* 2010;76:54-9.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015;348:56-61.
- Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515:568-71.

Adesione alle raccomandazioni dei gruppi di studio SIBioC-SIPMeL (Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio) e SID (Società Italiana di Diabetologia) sulla fase preanalitica per la determinazione della glicemia: ancora margini di miglioramento. Risultati di una indagine conoscitiva nazionale

Alessandro Terreni¹, Mariarosa Carta², Davide Giavarina³, Valentino Miconi⁴, Andrea Mosca⁵, Graziella Bonetti⁶ per il Gruppo di Studio intersocietario SIBioC-SIPMeL "Diabete Mellito" e per il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità Extra-Analitica del dato di laboratorio

¹Centro Regionale di Riferimento per la Verifica Esterna di Qualità, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

²⁻³Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

⁴SIPMeL, Castelfranco Veneto, Treviso

⁵Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi, Milano

⁶Laboratorio di Patologia Clinica, ASST-Valcamonica, Esine, Brescia

ABSTRACT

Adherence to the recommendations of the SIBioC-SIPMeL (Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio) and SID (Società Italiana di Diabetologia) study groups on the preanalytical phase for blood glucose measurement: still room for improvement. A National Survey on the state of art.

Introduction: glucose measurement is pivotal in the management of subjects with diabetes mellitus. Laboratories should provide the most useful information to the clinician in order to ensure the best patient outcome.

Methods: in October 2019 a survey has been conducted by SIBioC and SIPMeL Study Groups on "Diabetes Mellitus" and by the Italian Diabetes Society to verify if their recommendations on preanalytical phase have had an impact on Italian laboratory procedures. Fifteen questions were submitted to all SIBioC and SIPMeL members and 190 complete responses were collected, corresponding to around 5% of all Italian laboratories.

Results: 74% of the laboratories (n=46) are aware of the recommendations of the "Diabetes Mellitus" Study Groups, but only 24% apply them. 61% of the first group centrifuges the collection tubes immediately, providing a rapid plasma separation; 9% place the tubes immediately in an ice-water slurry and separate the plasma within 30 minutes. Only 14 of the responders use citrate buffer/sodium EDTA/sodium fluoride (NaF) tube in lyophilic formulation.

The survey allowed to determine also which kind of tube is commonly used: for outpatients, 52 (30%) laboratories use serum or heparinized tubes with separator gel, 46 (24%) of the remaining of laboratories use NaF plasma and heparinized plasma tubes. For hospitalized patients, 99 (52%) laboratories utilizes tubes with separator gel or coagulation activator, while 19 (10%) and 15 (8%) respectively use NaF plasma and heparinized plasma. To perform the Oral Glucose Tolerance Test (OGTT), 84 (43%) laboratories uses tubes without glycolysis inhibitors or separator gel, and only 12 laboratories uses tubes with acidified ternary mixture.

Conclusion: considering these non-completely satisfactory findings, the educational activity of SIBioC working groups on "Diabetes Mellitus" and "Variability of Extra-analytical phase" should be continued, since they appear to be essential for the improvement of the laboratory procedures.

Parole chiave: diabete, fase pre-analitica, raccomandazioni

INTRODUZIONE

La misura della glicemia a digiuno o dopo carico orale di glucosio riveste un ruolo centrale nella

diagnosi di diabete mellito e nel monitoraggio del paziente diabetico (1). La fase pre-analitica è critica per le numerose problematiche che può presentare (2) e in particolare l'anticoagulante e la matrice biologica

Corrispondenza a: Alessandro Terreni, Dipartimento dei servizi, SOD Sicurezza e Qualità, A.O.U. Careggi - Pad 69/A, Largo Brambilla 3, 50141 Firenze, E-mail terrenia@aou-careggi.toscana.it, Tel 055-7948982

Ricevuto: 28.01.2021

Revisionato: 18.03.2021

Accettato: 24.03.2021

Pubblicato on-line: 26.04.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.022

possono portare a differenze di risultati significative da un punto di vista clinico (3). Questo ha indotto le principali società scientifiche e alcuni organismi professionali a raccomandare la misura della glicemia su plasma; idealmente la provetta andrebbe posizionata in un bagno di acqua e ghiaccio fondente e centrifugata entro 30 minuti, oppure centrifugata immediatamente dopo il prelievo e il plasma separato subito dalla parte corpuscolata (3).

Questa procedura può risultare complessa a causa dell'organizzazione dei punti/sedi prelievo e dei laboratori, che spesso non permette una centrifugazione rapida dei campioni. Per ovviare a tali problemi è necessario l'utilizzo di anticoagulanti in grado di inibire gli enzimi della glicolisi.

Nuovi inibitori della glicolisi

Negli ultimi 10 anni è stato quindi proposto e raccomandato dalla National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), l'utilizzo di provette contenenti acido citrico (che blocca la via glicolitica nelle sue fasi iniziali) e sodio fluoruro (NaF) (che garantisce una inibizione a lungo termine) in tutti quei casi in cui non può essere assicurata una immediata centrifugazione del campione (3). La provetta con miscela ternaria acidificata (citrato + Na EDTA + NaF) dedicata alla misura della glicemia, è stata validata anche per la esecuzione della curva da carico orale di glucosio (OGTT) e per lo screening del diabete gestazionale (4-6). Il Gruppo di Studio (GdS) sulla Fase Pre-analitica di EFLM (European Federation Laboratory Medicine) ha indicato come l'impiego delle provette con miscela acidificata rappresenti un considerevole passo avanti verso una maggior accuratezza nella misura della glicemia (7). Tutto ciò ha portato nel 2018 il GdS intersocietario SIBioC-SIPMeL "Diabete Mellito" unitamente alla Società Italiana di Diabetologia (SID) a sintetizzare, in un documento dedicato, le principali indicazioni per riuscire a ottimizzare la fase pre-analitica della glicemia in ambito diabetologico (8) (Tabella 1).

Tabella 1

Sintesi delle raccomandazioni del 2018 (ref.8)

Per lo screening e la diagnosi del diabete mellito, compreso il diabete gestazionale:

1. Il soggetto deve essere a digiuno da almeno 8 ore e non oltre le 12 ore. Non deve aver presentato di recente febbre, infezioni acute o aver subito recenti traumi o interventi chirurgici.
 2. La determinazione della glicemia deve essere eseguita su plasma con metodo enzimatico.
 3. Deve essere ottenuto un efficace blocco della glicolisi mediante l'impiego di uno dei seguenti metodi:
 - 3.1. posizionando la provetta in acqua con ghiaccio fondente e centrifugandola entro 30 minuti, oppure
 - 3.2. centrifugando immediatamente la provetta e separando il plasma dalla parte corpuscolata, oppure
 - 3.3. impiegando, qualora i procedimenti e i tempi di cui sopra non possano essere rispettati, un anticoagulante in grado di svolgere una rapida e duratura inibizione della glicolisi (NaF, tampone citrato, EDTA), presente in forma liofila oppure in forma liquida (in tal caso sarà applicato un opportuno fattore di conversione).
 4. Nelle condizioni di cui sopra la glicemia è stabile per 48 ore a temperatura ambiente, 24 ore a 37°C e per 3 giorni a 4-6°C.
- Per la misura della glicemia ai fini del monitoraggio del controllo glicemico nel paziente con diabete noto si possono continuare ad utilizzare provette con litio-eparina con rapida centrifugazione e analisi o siero con acceleratore della coagulazione e gel separatore.

Obiettivo dell'indagine

Con lo scopo di valutare a distanza di alcuni anni l'impatto delle indicazioni già emanate sulla fase pre-analitica della misurazione della glicemia nei laboratori italiani, è stata proposta un'indagine conoscitiva per verificare se e quanto le indicazioni dei GdS SIBioC-SIPMeL (8) fossero state recepite e abbiano inciso sull'armonizzazione della fase pre-analitica. Scopo di questo lavoro è riportare e discutere i risultati ottenuti.

METODI

È stato preparato dai GdS Diabete mellito e Variabilità Extra Analitica del dato di Laboratorio (VEA) di SIBioC, un questionario composto da 15 domande che è stato distribuito in modalità elettronica a tutti i soci SIBioC e SIPMeL tramite il software "Survey Monkey" nell'ottobre del 2019. Il questionario è stato disponibile in linea per un mese. Le prime 6 domande riguardavano caratteristiche del laboratorio reclutato, mentre le altre 9 prendevano in considerazione i parametri relativi alla misurazione della glicemia.

Criteri di elaborazione del questionario

I questionari ricevuti sono stati valutati dopo l'applicazione dei seguenti criteri:

- eliminazione dei questionari doppi, cioè provenienti dallo stesso laboratorio;
- eliminazione dei questionari nulli, ovvero inviati ma non compilati;
- utilizzo dei dati dei questionari incompleti (che non presentavano tutte le risposte).

RISULTATI

Sono state ricevute 216 risposte; i questionari considerati validi, dopo eliminazione dei doppi (n=5) e dei nulli (n=21), sono risultati 190. La Tabella 2 presenta i risultati ottenuti dall'analisi delle risposte.

Tabella 2

Indagine informativa sull'applicazione delle raccomandazioni della fase preanalitica della glicemia a cura del GdS Intersocietario (SIBioC-SIPMeL-SID) Diabete Mellito e GdS Variabilita' Extra-Analitica SIBioC

| Domanda | Risposte n (%) |
|---|-------------------|
| 1- La struttura in cui lavori è: | |
| • Laboratorio privato accreditato | 58 (30) |
| • Laboratorio ospedaliero pubblico | 95 (50) |
| • Laboratorio ospedaliero/universitario | 27 (14) |
| • Laboratorio ospedaliero privato | 5 (3) |
| • Laboratorio privato non accreditato | 3 (2) |
| • Laboratorio IRCCS | 2 (1) |
| 2- Secondo la classificazione dell'OMS il tuo laboratorio è: | |
| • Piccolo (500-1 milione di test/anno) | 86 (45) |
| • Medio (2-3 milioni di test/anno) | 61 (32) |
| • Grande (più di 3 milioni test/anno) | 43 (23) |
| 3- In quale regione si trova il tuo laboratorio: | |
| • Abruzzo | 7 |
| • Basilicata | 6 |
| • Calabria | 3 |
| • Campania | 15 |
| • Emilia-Romagna | 4 |
| • Friuli-Venezia Giulia | 4 |
| • Lazio | 17 |
| • Liguria | 3 |
| • Lombardia | 34 |
| • Marche | 5 |
| • Piemonte | 8 |
| • Puglia | 10 |
| • Sardegna | 5 |
| • Sicilia | 7 |
| • Toscana | 31 |
| • Valle d'Aosta | 1 |
| • Veneto | 26 |
| • Provincie Autonome di Trento e Bolzano | 2 |
| • Umbria | 1 |
| • Molise | 1 |
| 4- Quante determinazioni di glicemia vengono effettuate all'anno nel tuo laboratorio | |
| • <50 000 | 64 (34) |
| • 50 000-100 000 | 47 (25) |
| • 100 000-200 000 | 35 (18) |
| • >200 000 | 44 (23) |
| 5- Il tuo Laboratorio effettua prestazioni per centri diabetologici: | |
| • SI | 111 (58) |
| • NO | 79 (42) |
| 6- Sei a conoscenza che il GdS Diabete di SIBioC e SIPMeL con SID ha pubblicato nel 2018 le Raccomandazioni sulla gestione della fase preanalitica in ambito diabetologico? https://www.sibioc.it/bc/download/articolo/1428 | |
| • SI | 141 (74) |
| • NO | 49 (26) |

Tabella 2*Continua*

| | |
|---|----------|
| 7- Nel tuo laboratorio applichi le raccomandazioni: | |
| • Sì (menù a tendina con tipologia di trattamento del campione) | 46 (24) |
| ◦ Centrifugazione immediata delle provette e separazione plasma da parte corpuscolata | 95 (50) |
| ◦ Immersione immediata campione in ghiaccio fondente e separazione plasma da parte corpuscolata entro 30' dal prelievo | 4 |
| ◦ Impiego di un inibitore immediato glicolisi come tampone citrato/NaF/EDTA | 14 |
| • No (menù a tendina) | 144 (76) |
| ◦ Lo farò entro 6 mesi | 10 (7) |
| ◦ Lo farò entro 1 anno | 14 (14) |
| ◦ Lo farò entro 2 anni | |
| ◦ Lo farò entro 3 anni | |
| ◦ Lo farò entro 4 anni | 1 (1) |
| ◦ Lo farò con la prossima gara di acquisizione dispositivi di prelievo/provette | 5 (3) |
| ◦ Non le applicherò mai nel mio laboratorio | 9 (6) |
| ◦ Non risponde | 105 (73) |
| 8- Ritieni applicabili queste raccomandazioni nel tuo Laboratorio? | |
| • Sì | 117 (62) |
| • No | 9 (5) |
| • Non risponde | 64 (33) |
| 9- Solo per chi ha risposto NO alla domanda precedente Quali sono le principali problematiche legate alla sua applicazione | |
| • Costi | 3 (2) |
| • Difficoltà organizzative legate ai rapporti con i clinici | 5 (3) |
| • Difficoltà organizzative legate all'organizzazione del laboratorio | 11 (8) |
| • Poco rilevante dal punto di vista pre-analitico | 4 (3) |
| • Non risponde | 121 (84) |
| 10- Se impieghi per la glicemia provette con miscela acidificata ternaria, indica in quale formulazione: | |
| • Liofila | 14 (100) |
| • Liquida | - |
| 11- Indica la tipologia di provetta usata per OGTT: | |
| • Siero | 8 (5) |
| • Siero con attivatore coagulazione | 16 (9) |
| • Siero con separatore | 35 (20) |
| • Plasma eparinato (Li/Na) | 19 (11) |
| • Plasma eparinato (Li/Na) con separatore | 6 (3) |
| • Plasma NaF/Kox | 8 (5) |
| • Plasma NaF/EDTA | 28 (16) |
| • Plasma NaF/EDTA/citrato (miscela ternaria acidificata) | 12 (7) |
| • Non risponde | 43 (24) |
| 12- Indica la tipologia di provetta impiegata per la glicemia dei pazienti ricoverati (routine): | |
| • Siero | 14 (7) |
| • Siero con attivatore coagulazione | 23 (12) |
| • Siero con separatore | 56 (29) |
| • Plasma eparinato (Li/Na) | 15 (8) |
| • Plasma eparinato (Li/Na) con separatore | 20 (11) |
| • Plasma NaF/Kox | 6 (3) |
| • Plasma NaF/EDTA | 8 (4) |
| • Plasma NaF/EDTA/citrato (miscela ternaria acidificata) | 5 (3) |
| • Non risponde | 43 (23) |

Tabella 2
Continua

| | |
|---|---------|
| 13- Indica la tipologia di provetta impiegata per la glicemia degli pazienti ambulatoriali: | |
| • Siero | 12 (6) |
| • Siero con attivatore coagulazione | 18 (9) |
| • Siero con separatore | 39 (21) |
| • Plasma eparinato (Li/Na) | 14 (8) |
| • Plasma eparinato (Li/Na) con separatore | 13 (7) |
| • Plasma NaF/Kox | 16 (8) |
| • Plasma NaF/EDTA | 21 (11) |
| • Plasma NaF/EDTA/citrato (miscela ternaria acidificata) | 13 (7) |
| • Non risponde | 44 (23) |
| 14- Puoi indicare quanto tempo trascorre in media nel tuo laboratorio tra il prelievo e l'esecuzione della glicemia per PAZIENTI RICOVERATI: | |
| • <30 min | 23 (12) |
| • 30-60 min | 66 (35) |
| • 1-2 h | 42 (22) |
| • 2-3 h | 12 (6) |
| • 3-5 h | 3 (2) |
| • >5 h | - |
| • Non risponde | 44 (23) |
| 15- Puoi indicare quanto tempo trascorre in media nel tuo laboratorio tra il prelievo e l'esecuzione della glicemia per PAZIENTI AMBULATORIALI: | |
| • <30 min | 11 (6) |
| • 30-60 min | 37 (19) |
| • 1-2 h | 46 (24) |
| • 2-3 h | 40 (21) |
| • 3-5 h | 8 (5) |
| • >5 h | 4 (2) |
| • Non risponde | 44 (23) |

NaF, sodio fluoruro; NaFKox, sodio fluoruro-potassio-ossalato

Caratteristiche dei laboratori

Le prime tre domande di introduzione al questionario inquadravano la tipologia e la zona geografica del laboratorio partecipante. Il 65% delle risposte proveniva da laboratori pubblici e il 35% da laboratori privati.

La distribuzione geografica delle risposte pervenute è stata la seguente: 43% Italia settentrionale, 32% Italia centrale e 25% Italia meridionale e insulare (Tabella 2, domande 1-3).

Conoscenza delle raccomandazioni

Rispetto al recepimento e all'adesione alle raccomandazioni, con specifico riferimento all'applicazione delle raccomandazioni sulla fase pre-analitica, 46 (24%) laboratori hanno dichiarato che le applicano, il 61% di questi centrifugando le provette all'arrivo in laboratorio e separando immediatamente il plasma dalla parte corpuscolata, il 9% immergendo le provette in ghiaccio fondente e separando il plasma dalla parte corpuscolata entro 30 minuti; il rimanente 30% dei

laboratori utilizza la provetta con miscela ternaria in formulazione liofila.

È stato inoltre richiesto quanto i laboratori percepissero come applicabili le raccomandazioni sulla fase pre-analitica della glicemia nella propria realtà e le possibili problematiche legate alla loro implementazione (Tabella 2, domande 7-9).

Tipologia di provette utilizzate

Solo 14 laboratori utilizzano provette con miscela acidificata ternaria e tutti fanno uso della formulazione liofila. La Tabella 3 riporta la distribuzione delle diverse tipologie di provette impiegate in base alla afferenza dei pazienti (interni/esterni) e in base alla tipologia di esame (glicemia/OGTT).

DISCUSSIONE

Il primo aspetto da sottolineare è il risultato ottenuto in termini di rappresentatività del questionario

Tabella 3

Tipologie di provette impiegate per la misura della glicemia in soggetti esterni, interni e per la curva da carico orale di glucosio (OGTT)

| Tipologia di provette n(%) | Provetta impiegata per la misurazione della glicemia dei pazienti ambulatoriali: | Provetta impiegata per misurazione della glicemia dei pazienti ricoverati (routine): | Provetta impiegata per OGTT: |
|--|--|--|------------------------------|
| Plasma eparinato (Li/Na) | 14 (7) | 15 (8) | 19 (11) |
| Plasma eparinato (Li/Na) con separatore | 13 (7) | 20 (11) | 6 (3) |
| Plasma NaF/EDTA | 21 (12) | 8 (4) | 28 (16) |
| Plasma NaF/EDTA/citrato (miscela ternaria acidificata) | 13 (7) | 5 (3) | 12 (7) |
| Plasma NaF/Kox | 16 (8) | 6 (3) | 8 (5) |
| Siero | 12 (6) | 14 (7) | 8 (5) |
| Siero con attivatore coagulazione | 18 (9) | 23 (12) | 16 (9) |
| Siero con separatore | 39 (21) | 56 (29) | 35 (20) |
| Non risponde | 44 (23) | 43 (23) | 43 (24) |

NaF, sodio fluoruro; NaFKox, sodio fluoruro-potassio-ossalato

sottoposto: il campione rappresenta circa il 5% di tutti i laboratori di analisi chimico cliniche che misurano la glicemia in Italia (9). Inoltre, l'adesione da parte dei professionisti di laboratorio, risultata numericamente simile a quella riscontrata nel corso di altre indagini societarie, indica come le problematiche pre-analitiche connesse a questa patologia siano percepite come rilevanti. La distribuzione territoriale dei laboratori partecipanti è risultata abbastanza bilanciata. Per quanto riguarda la tipologia di laboratorio che ha partecipato al questionario, il numero di laboratori di piccole dimensioni rappresenta il metà del totale, riflettendo probabilmente la struttura organizzativa del sistema sanitario di alcune regioni, i cui laboratori hanno maggiormente risposto al questionario (ad esempio Lombardia, Lazio, Campania) e nelle quali la presenza di strutture private appare più marcata (ad esempio Lazio e Campania).

In ogni caso, a livello nazionale il numero di strutture pubbliche che hanno risposto al questionario risulta nettamente maggiore rispetto a quello delle private (65% versus 35%), in particolare le regioni con maggior numero di risposte da parte di laboratori pubblici sono: Toscana, Veneto e Lombardia.

Relativamente al numero di determinazioni di glicemia, più della metà dei laboratori effettua meno di 100 000 misurazioni/anno, ovvero, potendosi così definire, in base alla classificazione OMS, come di dimensione piccola o media. Inoltre, più della metà di tutti i laboratori intervistati, dichiara di fornire prestazioni per conto di centri diabetologici e quindi di essere inquadrabili come laboratori non strettamente di base, cioè a maggior complessità organizzativa.

Gestione della fase pre-analitica della glicemia

A dimostrazione dell'importanza delle azioni intraprese dai GdS societari nel promuovere e divulgare specifiche raccomandazioni, la prima domanda sulla gestione della fase preanalitica in ambito diabetologico evidenzia che un elevato numero di colleghi è a conoscenza delle raccomandazioni del GdS Diabete Mellito, ma allo stesso tempo solo 1/4 dei laboratori le applica, evidenziando la difficoltà di trasferire le evidenze scientifiche nella pratica di tutti i giorni. In particolare, il 59% dei laboratori pubblici (appartenenti a Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico – IRCCS, Aziende Ospedaliere Universitarie - AOU, Unità Sanitarie Locali, USL) ritiene applicabili le raccomandazioni, mentre tra i laboratori privati questo valore cresce fino al 65%, a dimostrazione che realtà più piccole possono probabilmente mettere in atto comportamenti virtuosi più facilmente rispetto a strutture di grandi dimensioni, più complesse dal punto di vista gestionale e meno flessibili da un punto di vista amministrativo. Questi aspetti appaiono confermati dalle risposte alla domanda 7, dove più della metà dei laboratori di piccole dimensioni applicano le raccomandazioni effettuando una centrifugazione immediata del campione e separazione del plasma dalla parte corpuscolata, mentre solo 14 sceglie di usare provette specifiche con miscela ternaria acidificata e di questi più della metà sono laboratori di grande e medie dimensioni (11 laboratori pubblici e 3 privati). Inoltre, tra i principali fattori che hanno portato i laboratori a non implementare da subito le indicazioni, c'è la complessità organizzativa del laboratorio: 30

laboratori che non hanno ancora applicato le indicazioni dichiarano di essere intenzionati a farlo alla prossima gara o nei prossimi mesi o anni e la maggior parte di questi, circa il 30% (la quasi totalità laboratori pubblici), attribuisce a problematiche organizzative il ritardo nell'implementazione.

Scelta delle provette

L'indagine relativa alla tipologia di provette impiegate per la misura della glicemia in soggetti esterni, interni e per l'OGTT, e al tempo medio trascorso prima della misura della glicemia, ha registrato un elevato numero di mancate risposte (n=44).

Lo stato dell'arte sull'utilizzo delle diverse tipologie di provette, mostra una prevalenza d'impiego delle provette senza inibitori della glicolisi per i pazienti non ospedalizzati con una preferenza per le provette provviste di gel separatore. Le provette con NaF in tutte le sue formulazioni, sono scelte da 46 partecipanti nei vari ambiti, mentre il restante dei partecipanti adotta provette eparinate. La situazione risulta diversa per le provette utilizzate per i pazienti ospedalizzati, dove la maggioranza di laboratori sceglie di lavorare con provette senza inibitori della glicolisi. È da notare come, nel corso degli anni, i laboratori abbiano correttamente adottato dispositivi di prelievo per contenere l'errore pre-analitico, diversificando le diverse tipologie di provette usate per soggetti ospedalizzati e non, a dimostrazione che le criticità pre-analitiche della misura della glicemia sono ben presenti alla maggior parte dei laboratori italiani. Questa osservazione viene confermata anche dalle risposte alle ultime due domande del questionario, dove viene evidenziato che il tempo medio per l'esecuzione della glicemia è inferiore a un'ora nel 47% dei casi nei pazienti interni, mentre nei soggetti esterni scende al di sotto dei 60 minuti solo nel 25% dei casi. Per quanto riguarda la tipologia di provetta utilizzata per l'OGTT, risulta elevato il numero di laboratori che dichiara di usare provette senza inibitori della glicolisi [84 (43%)], mentre 51 laboratori adottano provette con solo NaF. Questa provetta inibisce l'enzima e quindi solo la parte finale della glicolisi, non permettendo il mantenimento del reale livello glicemico. Solo 12 laboratori utilizzano provette con miscela ternaria acidificata, le uniche in grado di bloccare sia gli enzimi che agiscono precocemente nella via glicolitica che quelli che agiscono più tardivamente. Inoltre bisogna segnalare che ad oggi circa la metà dei laboratori non adottano nessun tipo di dispositivi per limitare l'errore preanalitico nell'esecuzione della glicemia per pazienti esterni, contesto in cui la misurazione della glicemia riveste un ruolo diagnostico fondamentale.

CONCLUSIONI

Questa indagine, pur limitata ad un campione di laboratori pubblici e privati affiliati a società scientifiche,

è comunque ben rappresentativa della situazione generale, per territorialità, dimensione e tipologia delle strutture. Le raccomandazioni nazionali sono abbastanza diffuse e conosciute, ma la loro applicazione e adattamento alle diverse realtà operative risulta ancora variabile. Ad esempio, la lavorazione della provetta entro 30 minuti, previa stabilizzazione con ghiaccio fondente o con centrifugazione immediata e separazione del plasma, tale da garantire un blocco efficace della glicolisi, appare essere l'approccio più congeniale per i laboratori di piccole dimensioni, in particolare per le strutture private.

In tutti i casi in cui queste tempistiche di lavorazione non possono essere rispettate, si dovrebbero utilizzare centrifughe per separare rapidamente il siero/plasma dagli elementi cellulari, oppure utilizzare provette contenenti NaF, tampone citrato ed EDTA.

È comprensibile che la centrifugazione immediata possa risultare complicata in molte situazioni, come evidenziato dal limitato numero di laboratori (n=28) che l'adotta, tuttavia è meno chiaro perché l'uso delle provette con NaF, tampone citrato ed EDTA sia così limitato; ad oggi questa scelta lavorativa è stata adottata da poche strutture, per lo più laboratori ospedalieri pubblici collegati a centri diabetologici.

È auspicabile quindi che nei prossimi anni, con le future gare di acquisizione dei dispositivi di prelievo/provette, un consistente numero di laboratori adotti le provette acidificate con miscela ternaria per la misura della glicemia nei pazienti non ospedalizzati e per effettuare le curve da carico di glucosio. In tal modo la glicemia sarà stabile per 48 ore a temperatura ambiente, 24 ore a 37°C e per 3 giorni a 4-6°C.

Obiettivo dei GdS Diabete Mellito e VEA nei prossimi anni sarà quello di adoperarsi agendo a diversi livelli, per favorire l'implementazione delle raccomandazioni, continuando a lavorare in sinergia con le principali società di diabetologia presenti in Italia, principalmente attraverso i suoi delegati e cercando di creare rapporti con altri portatori di interesse (stakeholders) per permettere una più capillare applicazione delle indicazioni per una corretta misura della glicemia, prefiggendosi di rivalutare più avanti nel tempo i risultati attraverso una nuova indagine, utilizzando anche nuovi indicatori.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per la collaborazione tutti i soci partecipanti al questionario on-line sull'applicazione delle raccomandazioni della fase preanalitica della glicemia a cura del GdS intersocietario Diabete Mellito e GdS Variabilità Extra-Analitica, promosso da SIBioC e SIPMeL.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33:S62-69.
2. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, et al. *Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results.* 4th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009:6-14.
3. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendation for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-9.
4. Bonetti G, Giavarina D, Urbani D. Il tipo di campione per la curva da carico orale di glucosio è fondamentale per una corretta identificazione del diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:143-8.
5. Carta M, Giavarina D, Bonetti G. Impatto delle variabili preanalitiche e analitiche sulla diagnosi di diabete mellito gestazionale. *Biochim Clin* 2020;44:206-8
6. van der Hagen EAE, Fokkert MJ, Kleefman AMD, et al. Technical and clinical validation of the Greiner FC-Mix glycaemia tube. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1530-6.
7. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, et al. Blood glucose determination: effect of tube additives. *Adv Clin Chem* 2018;84:101-23.
8. Bonetti G, Carta M, Lapolla A, et al. Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico. *Biochim Clin* 2018;42:263-65.
9. Spandonaro F, d'Angela D, Polistena B. 15° Rapporto Sanità. Il ritorno della Politica Nazionale in Sanità (?). https://www.creasanita.it/15volume_dwn/Libro_exe_01.pdf (ultimo accesso: marzo 2021)

Questionario conoscitivo sull'Esame Chimico Morfologico delle Urine in Italia a cura del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica dell'Apparato Urinario

Rudi Ravasio^{1,5}, Maria Aurora Burgio^{2,5}, Fiamma Balboni^{3,5}, Fabio Manoni^{4,5}

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

²Unità Operativa di Patologia Clinica, Ospedale Barone Lombardo, Canicatti (Ag)

³Laboratorio Analisi IFCA, Firenze

⁴Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Ospedali Riuniti Padova Sud "Madre Teresa di Calcutta", Monselice (PD)

⁵Gruppo Intersocietario Laboratorio e Clinica dell'Apparato Urinario (GIAU)

ABSTRACT

Results of the survey on chemical and morphological examination of urine in Italy issued by the Italian Interdisciplinary Urinalysis Group.

Introduction: the Italian Interdisciplinary Urinalysis Group (GIAU) is a study group aimed to harmonize the standard chemical and morphological urine examination in Italy. The aim of this paper is to present the results of a survey recently released. The survey has been prepared to evaluate the state of the art of the routine standard urine examination in Italy after the issuing by GIAU of the recommendations related to the pre-analytical, analytical and post-analytical phases of the Urine Chemical Morphological Examination (ECMU).

Methods: the questionnaire (47 questions) was made available through the web-based Survey Monkey platform to the members of the two Italian Laboratory Medicine scientific societies (SIBioC and SIPMeL).

Results: 553 replies were collected. Regarding the pre-analytical phase, the most critical issue is the use of a monitored (time and temperature) sample transportation to the clinical laboratory only by a small percentage of the laboratories (30%). More than 80% of the laboratories recommends the collection of the mid-stream urine. Regarding the analytical phase, the majority of the participants utilizes dedicated automated analyzers for urine sediment. Only 15.5% of the participants includes the albumin to creatinine ratio in the standard urine examination.

Discussion: the results of the survey give a picture of the state of art of the standard urine examination in Italy. From the comparison with the GIAU previous surveys, it can be concluded that the urinalysis practice in Italy is nowadays more compliant to the indications of the available recommendations and that a general improvement of this laboratory test is observed. Some unsatisfactory answers have been collected for a number of issues, so the role of the GIAU is and will remain fundamental to guide all the laboratory professionals who operate in this laboratory medicine field, towards further advancements.

Parole chiave: esame chimico morfologico delle urine, linee guida, raccomandazioni

INTRODUZIONE

Il Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica dell'Apparato Urinario (GIAU) nel quale confluiscono decine di specialisti di laboratorio e clinici di diverse società scientifiche [SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL), Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI), Società Italiana di Nefrologia (SIN)], da anni promuove

un approccio all'Esame Chimico e Morfologico delle Urine (ECMU) coerente con le esigenze cliniche e con l'evolvere degli strumenti diagnostici disponibili. Nel 2009, nel corso del congresso "Urinalysis", era stato predisposto un questionario per i partecipanti dal quale era emersa la necessità di disporre di Linee Guida (LG) che permettessero di avere una solida base di partenza per affrancare l'ECMU, da una tradizione con sempre meno ragioni d'essere, orientandolo a divenire un esame

Corrispondenza a: Rudi Ravasio, UOC SMel2 Analisi Chimico Cliniche, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS 1, Bergamo 24127, Tel 0352678133, E-mail rravasio@asst-pg23.it

Ricevuto: 15.02.2021

Revisionato: 23.03.2021

Accettato: 01.04.2021

Publicato on-line: 30.04.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.024

di laboratorio con maggiore utilità clinica. Considerata la carenza di raccomandazioni e LG sull'ECMU in campo nazionale, il GIAU ha pertanto sentito l'esigenza di redigere le LG della fase preanalitica nel 2011 (1), le LG della fase analitica nel 2016 (2) e le raccomandazioni per la fase post-analitica nel 2019 (3). Nel 2016, il GIAU aveva predisposto un primo questionario per conoscere la situazione della realtà italiana e valutare l'impatto che i progressi scientifici, metodologici e strumentali avevano avuto nei laboratori italiani e i cui risultati avrebbero costituito un punto di riferimento per valutare in futuro l'impatto delle LG e delle raccomandazioni sul modo di operare. Nel 2019, il GIAU ha predisposto un nuovo questionario con il duplice scopo di verificare se e come fosse cambiato l'approccio all'ECMU nel corso degli anni e di valutare il livello di conoscenza e applicazione delle raccomandazioni disponibili. Scopo del presente lavoro

è la presentazione dei risultati ottenuti e la loro diffusione e discussione.

METODI

Il questionario predisposto (Tabella 1) era costituito da 47 domande, finalizzate a raccogliere informazioni riguardo la tipologia e le dimensioni dei laboratori partecipanti, le modalità operative adottate nelle fasi preanalitica (modalità di raccolta, istruzioni operative per l'utente esterno, tipologia di contenitori, conservazione e trasporto dei campioni), analitica (livello di automazione, metodi di laboratorio, parametri refertati, preparazione e lettura del sedimento, modalità di esecuzione del CQI, partecipazione a programmi di VEQ) e post-analitica (struttura del referto, unità di misura, ambiti di riferimento, note e commenti, valutazione dei casi critici).

Tabella 1

Domande del questionario

Domande

| | |
|--|--|
| 1. Tipo di laboratorio | 25. Se si attraverso chimica liquida, specificare la metodica utilizzata |
| 2. Numero di urine/die | 26. Disponete di un microscopio a contrasto di fase? |
| 3. L'ECMU deve far parte del profilo base della diagnostica? | 27. Disponete di un microscopio a luce polarizzata? |
| 4. Raccomandate la raccolta del mitto intermedio della prima urina del mattino? | 28. Disponete di una automazione per la valutazione del sedimento? |
| 5. Avete predisposto istruzioni scritte per la raccolta delle urine? | 29. Se sì, specificare la tipologia di automazione utilizzata |
| 6. Se sì, in quale altre lingue oltre all'italiano? | 30. Quale strategia analitica seguite nel vostro Laboratorio? |
| 7. Avete predisposto delle norme per validare l'idoneità del campione? | 31. Viene eseguita una valutazione ulteriore nei "casi critici"? |
| 8. Quanto tempo trascorre mediamente tra la raccolta dei campioni e l'esecuzione dell'ECMU? | 32. L'eventuale esame microscopico viene eseguito su urine centrifugate? |
| 9. Utilizzate un sistema di raccolta standardizzato? | 33. Se sì, a quanti g? (indicare la gravità specifica, non i giri della centrifuga) |
| 10. Utilizzate provette sottovuoto? | 34. Come è eliminato il surnatante? |
| 11. Utilizzate un sistema di trasporto con monitoraggio di tempo e temperatura? | 35. Avete predisposto specifiche Istruzioni Operative per la esecuzione di ECMU? |
| 12. Per l'esame chimico utilizzate una striscia reattiva? | 36. Eseguite una CQI per ECMU? |
| 13. Se sì quale? | 37. Eseguite una VEQ per ECMU? |
| 14. Se utilizzate le strisce, la lettura delle strisce è automatizzata? | 38. Nel referto riportate le metodiche utilizzate? |
| 15. Se sì, con quale analizzatore? | 39. Nel referto sono presenti le unità di misura? |
| 16. Quali di questi parametri chimici determinate, considerati "non necessari" dalle recenti LG? | 40. Come sono espressi i risultati dell'esame Chimico dell'ECMU? |
| 17. Refertate l'aspetto? | 41. Nel referto sono indicati gli ambiti di riferimento? |
| 18. Refertate il colore? | 42. Come sono espressi i risultati del sedimento? |
| 19. È presente sulla striscia reattiva l'acido ascorbico? | 43. Nel referto sono presenti note sulla idoneità del campione? |
| 20. Se sì lo refertate? | 44. Nel referto sono previsti commenti interpretativi? |
| 21. Determinate la concentrazione urinaria | 45. Viene risolta la discrepanza per indicatori dello stesso parametro (es. Emoglobine ed Emazie)? |
| 22. Se sì con quale metodo | 46. Se sì come? |
| 23. Nell'ECMU utilizzate il rapporto Albumina/Creatinina | 47. Partecipate ad un programma di VEQ sulla microscopia urinaria? |
| 24. Se sì attraverso striscia reattiva, specificare tipologia di striscia e il produttore | |

ECMU, esame chimico e morfologico delle urine; LG, linee-guida

I dati elaborati sono stati confrontati, ove possibile, con quelli ottenuti nei due precedenti questionari del 2009 e del 2016 al fine di ottenere una fotografia, la più aggiornata possibile, della realtà laboratoristica italiana, anche alla luce delle più recenti raccomandazioni proposte dal gruppo GIAU. Il questionario è stato proposto a tutti i soci attraverso la piattaforma informatica Survey Monkey da parte delle segreterie scientifiche di SIBioC e SIPMeL. Le istruzioni per la compilazione raccomandavano di compilare un unico questionario per ogni laboratorio in modo che non vi fosse la duplicazione di dati con conseguente alterazione dei risultati; tali dati sono stati poi verificati in fase di elaborazione, eliminando i rarissimi duplicati.

RISULTATI

Sono pervenute 553 risposte valide, 288 da soci SIBioC e 265 da soci SIPMeL con un incremento della partecipazione rispetto al precedente questionario del 2016 diffuso con le stesse modalità (342 risposte in totale), e notevolmente maggiore di quello del 2009 (solo 83 risposte, ma diffuso solo ai partecipanti al convegno "Uninanalysis"); l'elevato numero di risposte ricevute fornisce un'immagine istantanea e attendibile dello stato dell'arte sull'ECMU in Italia, sebbene talvolta alcune risposte non fossero complete in ogni parte.

Le domande a risposta "predefinita" hanno avuto infatti una risposta attendibile, numericamente valida, mentre le domande a risposta "aperta", che prevedevano descrizioni libere, sono risultate dispersive e poco accuratamente interpretabili.

La risposta all'invito a partecipare all'indagine è stata, oltre che estesa, anche rapida; infatti la compilazione del questionario sulle piattaforme informatiche è stata quasi completamente completata entro i primi 15 giorni dalla sua pubblicazione.

I risultati dei questionari sulla fase pre-analitica sono riportati nella Tabella 2.

Relativamente alle domande sulla tipologia di laboratorio, si ricava che la maggior parte dei partecipanti opera in laboratori inseriti in Ospedali pubblici, mentre una quota minoritaria opera in Ospedali privati, confermando quanto emerso nel 2016. Riguardo al numero di campioni di urine processati giornalmente si conferma quanto riscontrato nell'anno 2016, ossia la maggior parte dei laboratori processa giornalmente meno di 200 campioni di urine. Complessivamente, emerge una buona attenzione alla fase-preanalitica (Tabella 2) dato che circa il 70% dei laboratori ha predisposto delle norme per valutare l'idoneità del campione ed esegue l'ECMU tra le 2-4 ore dopo la raccolta, confermando peraltro i dati raccolti nel 2016. Un lieve miglioramento rispetto all'indagine precedente si è riscontrato relativamente al sistema di raccolta, con meno della metà dei laboratori che utilizza provette sottovuoto (41% *versus* 31%). Persiste il dato negativo (<30% dei laboratori) relativo alla mancata adozione di un sistema di trasporto con monitoraggio di tempo e

temperatura, confermando il dato del 2016.

I risultati relativi ai quesiti sulla fase analitica sono riportati in Tabella 3; in questo questionario sono state inserite numerose domande specifiche sui metodi utilizzati che non erano state poste nel 2016 e nel 2009, i risultati sono quindi inediti e non confrontabili. Oltre il 90% dei laboratori utilizza per l'esame chimico una striscia reattiva multiparametrica con lettura su strumentazione automatizzata confermando quanto già emerso nei precedenti questionari; un aspetto negativo interessante è che solo una quota minoritaria di laboratori (attorno al 20%) non referta parametri suggeriti come non-necessari e obsoleti dalle raccomandazioni disponibili. La maggior parte dei laboratori non inserisce nell'ECMU il rapporto albumina/creatinina (ACR) confermando di fatto quanto emerso nel 2016, mentre quasi il 70% dei partecipanti dispone di una automazione per l'analisi della frazione corpuscolata rilevando un leggero incremento rispetto al dato emerso nel 2016 (Tabella 3). L'esame microscopico viene eseguito prevalentemente su urine centrifugate dopo eliminazione del surnatante con modalità alquanto diverse e si conferma la scarsa disponibilità presso i laboratori italiani di microscopi a contrasto di fase e a luce polarizzata (Tabella 3).

I risultati relativi ai quesiti sulla fase organizzativa sono riportati in Tabella 4. La strategia analitica preferita nei laboratori partecipanti è quella che prevede l'impiego della striscia reattiva seguito dalla valutazione della frazione corpuscolata per tutti i campioni e microscopica solo in casi selezionati, inoltre il 71,5% dei laboratori esegue una valutazione ulteriore dei casi critici confermando quanto emerso nel 2016.

I risultati relativi ai quesiti sulla fase post-analitica sono riportati in Tabella 5. I dati, sono sostanzialmente allineati a quelli del 2016 e al riguardo occorre rilevare che poco meno della metà dei partecipanti riporta nel referto le metodiche utilizzate e risolve le discrepanze per indicatori dello stesso parametro (come ad esempio le eventuali discrepanze tra presenza di emoglobina e assenza di emazie, o viceversa).

DISCUSSIONE

La numerosa partecipazione all'indagine dei laboratori italiani ha permesso di ricavare un buon materiale di studio, che offre molti spunti di discussione e speculativi. Questo dimostra che l'ECMU è un esame considerato rilevante per il quale si è risvegliato l'interesse diagnostico nei laboratori Italiani, e all'interno del quale ogni professionista del laboratorio, sulla base delle proprie competenze, può dare un contributo nell'assicurare un Total Testing Progress ottimale (2). È infatti importante osservare che la quasi totalità dei partecipanti (92,5%) esprime la convinzione che l'esame delle urine dovrebbe sempre far parte del profilo della diagnostica di base, nel primo inquadramento del paziente.

Tabella 2

Risultati del questionario 2019 relativi alle domande sulla fase preanalitica; sono riportati per confronto i risultati dei due questionari precedenti (2016 e 2009).

| | 2019, % (n) | 2016, % (n) | 2009, % (n) |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Quesito: Tipo di laboratorio | | | np |
| Ospedale pubblico | 66,9% (349) | 54,4% (184) | |
| Ospedale privato | 15,4% (80) | 13,9 % (47) | |
| Ospedale privato non convenzionato | 0,8% (4) | np | |
| Laboratorio specializzato | 11,7% (61) | 1,5% (5) | |
| Laboratorio privato non convenzionato | 5,2% (27) | np | |
| Ospedale Universitario | np | 8,0% (27) | |
| Laboratorio Privato | np | 22,2% (75) | |
| Quesito: Numero di campioni di urine/die | | | np |
| < 50 | 24,8% (130) | 25,7% (84) | |
| 50-100 | 20,2% (106) | 24,2% (79) | |
| 100-200 | 23,2% (122) | 20,5% (67) | |
| 200-300 | 12,9% (68) | 11,0% (36) | |
| 300-400 | 6,3% (33) | 7,3% (24) | |
| 400-500 | 4,7% (25) | 4,3% (14) | |
| >500 | 7,9% (42) | 7,0% (23) | |
| Quesito: L'ECMU deve far parte del profilo base della diagnostica? | | | np |
| Si | 92,5% (396) | 86,0% (251) | |
| No | 7,5% (32) | 14,0% (41) | |
| Quesito: Raccomandate la raccolta del mitto intermedio della prima urina del mattino? | | | |
| Si | | | |
| No | 86,8% (376) | 87,2% (260) | 93,0% (77) |
| | 13,2% (57) | 12,8% (38) | 7,0% (6) |
| Quesito: Avete predisposto istruzioni scritte in italiano per la raccolta delle urine? | | | |
| Si | 69,8% (300) | 68,9% (204) | 68,0% (57) |
| No | 30,2% (130) | 31,1% (92) | 32,0% (26) |
| Quesito: Se si, in quale altre lingue oltre all'italiano? | | | np |
| Inglese | 68,6% (118) | 44,4%(40) | |
| Altre lingue straniere | 31,4% (54) | 55,6%(50) | |
| Quesito: Avete predisposto delle norme per validare l'idoneità del campione? | | | |
| Si | 67,9% (282) | 63,3% (183) | 42,0% (35) |
| No | 32,1% (133) | 36,7% (106) | 58,0% (48) |
| Quesito: Quanto tempo trascorre mediamente tra la raccolta dei campioni e l'esecuzione dell'ECMU? | | | np |
| 2-4 ore | 74,5% (315) | 76,7% (233) | |
| 4-6 ore | 23,2% (98) | 20,8% (57) | |
| > 6 ore | 2,3% (10) | 0 % (0) | |
| Non specificato | 0 | 2,5% (6) | |
| Quesito: Utilizzate un sistema di raccolta standardizzato? | | | np |
| Si | 64,8% (273) | 60,5% (178) | |
| No | 35,2% (148) | 39,5% (116) | |
| Quesito: Utilizzate provette sottovuoto? | | | np |
| Si | 41,1% (175) | 31,5% (93) | |
| No | 58,9% (251) | 68,5% (202) | |
| Quesito: Utilizzate un sistema di trasporto con monitoraggio di tempo e temperatura? | | | np |
| Si | | | |
| No | 29,9% (127) | 23,5% (69) | |
| | 70,1% (297) | 76,5% (225) | |

np, non previsto; ECMU, esame chimico e morfologico delle urine

Tabella 3

Risultati del questionario 2019 relativi alle domande sulla fase analitica; sono riportati per confronto i risultati dei due questionari precedenti (2016 e 2009).

| | 2019, % (n) | 2016, % (n) | 2009, % (n) |
|--|-------------|-------------|-------------|
| Quesito: Per l'esame chimico utilizzate una striscia reattiva? | | | |
| Si | 92,1% (267) | 90,9% (220) | 99,0% (68) |
| No | 7,9% (23) | 9,1% (22) | 1,0% (1) |
| Quesito: Se sì quale tipo e marca? | | | |
| Menarini ns | 35,0% (76) | np | np |
| Menarini Uriflet S 9UB | 19,2% (41) | | |
| Menarini Aution Sticks 10 PA | 4,2% (9) | | |
| Menarini Aution Sticks 10 EA | 1,5% (3) | | |
| Beckman | 10,3% (22) | | |
| Siemens n.s. | 6,1% (13) | | |
| Siemens Atlas | 0,9% (2) | | |
| Siemens Multistix 10 SG | 2,3% (5) | | |
| Dasit n.s. | 4,7% (10) | | |
| Dasit Uropaper Alfa | 3,0% (6) | | |
| Dirui serie H | 4,2% (9) | | |
| Roche n.s. | 2,3% (5) | | |
| Roche Combiscreen | 0,5% (1) | | |
| Roche Combur | 1,5% (3) | | |
| Medical System Uriscan | 2,3% (5) | | |
| Other | 2,0% (4) | | |
| Quesito: Se utilizzate le strisce, la lettura delle strisce è automatizzata? | | | |
| Si | 94,4% (267) | 92,5% (223) | 100% (69) |
| No | 5,6% (16) | 7,5% (18) | 0% |
| Quesito: Se sì, con quale analizzatore? | | | |
| Menarini Aution Max | 36,8 (84) | np | np |
| Menarini ns | 11,4 (26) | | |
| Menarini Superaution | 3,1 (7) | | |
| Beckman iCHEM Velocity | 11,4 (26) | | |
| Siemens Clinitek Atlas | 4,8 (11) | | |
| Siemens Clinitek Advantus | 2,2 (5) | | |
| Siemens Clinitek Novus | 2,2 (5) | | |
| Dasit n.s. | 5,7 (13) | | |
| US 3100 R plus Eiken | 5,3 (12) | | |
| Dirui H800 plus | 3,1 (7) | | |
| FUS 2000 Urinalysis Hybrid | 1,3 (3) | | |
| Roche Cobas 6500 | 0,4 (1) | | |
| Roche Cobas U411 | 0,8 (2) | | |
| Roche Urisys 2400 | 0,8 (2) | | |
| Roche Cobas U 601 | 0,8 (2) | | |
| Medical System Uriscan | 2,2 (5) | | |
| Dasit UC3500 | 1,8 (4) | | |
| Other | 5,7 (13) | | |
| Quesito: Quali di questi parametri chimici determinate, considerati "non necessari" dalle recenti LG? | | | |
| glicosuria | 20,7% (81) | np | np |
| chetoni | 14,8% (58) | | |
| bilirubina | 14,8% (58) | | |
| urobilinogeno | 24,3% (95) | | |
| nessuno dei parametri riportati | 25,4% (99) | | |
| Quesito: Refertate l'aspetto? | | | |
| Si | 90,3% (72) | np | np |
| No | 9,7% (28) | | |

Tabella 3
Continua

| | | | |
|---|-------------|-------------|------------|
| Quesito: Refertate il colore? | | np | np |
| Si | 89,0% (259) | | |
| No | 11,0% (32) | | |
| Quesito: È presente sulla striscia reattiva l'acido ascorbico? | | np | np |
| Si | 20,5% (60) | | |
| No | 79,5% (232) | | |
| Quesito: Se si lo refertate? | | np | np |
| Si | 30,0% (18) | | |
| No | 70,0% (42) | | |
| Quesito: Determinate la concentrazione urinaria? | | np | np |
| Si | 64,9% (185) | | |
| No | 35,1% (100) | | |
| Quesito: Se si con quale metodo | | np | np |
| Con striscia reattiva | 58,3% (114) | | |
| Con densitometro/urinometro | 7,6% (15) | | |
| Rifrattometro | 12,2% (24) | | |
| Misura della Conducibilità con strumento automatizzato | 21,9% (43) | | |
| Quesito: Nell'ECMU utilizzate il rapporto Albumina/Creatinina | | | np |
| Si | 15,5% (44) | 17,0% (41) | |
| No | 84,5% (240) | 83,0% (200) | |
| Quesito: Disponete di un microscopio a contrasto di fase? | | | np |
| Si | 59,2% (167) | 61,5% (147) | |
| No | 40,8% (116) | 38,5% (92) | |
| Quesito: Disponete di un microscopio a luce polarizzata? | | | np |
| Si | 37,0% (104) | 38,9% (91) | |
| No | 63,0% (177) | 61,1% (143) | |
| Quesito: Disponete di una automazione per la valutazione del sedimento? | | | np |
| Si | 69,7% (200) | 64,6% (157) | |
| No | 30,3% (87) | 35,4% (86) | |
| Quesito: Se si, specificare la tipologia di automazione utilizzata | | nd | |
| Microscopia automatizzata | 51,2% (102) | | 0% |
| Acquisizione di immagini | 22,4% (48) | | 37,2% (16) |
| Citofluorimetro | 26,4% (54) | | 62,8% (27) |
| Quesito: L'eventuale esame microscopico viene eseguito su urine centrifugate? | | | |
| Si | 79,7% (232) | 85,9% (207) | 73,0% (50) |
| No | 20,3% (59) | 14,1% (34) | 27,0% (19) |
| Quesito: Come è eliminato il surnatante? | | nd | nd |
| Aspirazione con pipetta Pasteur monouso | 23,3% (72) | | |
| Decantazione | 12,5% (30) | | |
| Capovolgendo la provetta velocemente | 53,7% (133) | | |
| Automatizzato | 7,5% (19) | | |
| Altro (specificare) | 3,0% (3) | | |

np, non previsto; nd, dato non disponibile; LG, linee-guida; ECMU, esame chimico e morfologico delle urine

Tabella 4

Risultati del questionario 2019 relativi alle domande sulla fase organizzativa; sono riportati per confronto i risultati dei due questionari precedenti (2016 e 2009).

| | 2019, % (n) | 2016, % (n) | 2009, % (n) |
|--|-------------|-------------|-------------|
| Quesito: Quale strategia analitica seguite nel vostro Laboratorio? | | | |
| solo striscia reattiva | 2,8% (8) | 1,2% (3) | 1,0% (1) |
| striscia reattiva su tutti + frazione corpuscolata al microscopio ottico su casi selezionati | 6,3% (18) | 9,1% (22) | 12,0% (8) |
| striscia reattiva su tutti + frazione corpuscolata automatizzata su casi selezionati | 1,0% (3) | 2,9% (7) | 6,0% (4) |
| striscia reattiva + frazione corpuscolata automatizzata su tutti i campioni | 15,3% (44) | 45,2% (109) | 55,0% (38) |
| striscia reattiva + frazione corpuscolata al microscopio ottico su tutti i campioni | 23,7% (68) | 30,3% (73) | 25,0% (17) |
| striscia reattiva + frazione corpuscolata automatizzata su tutti + microscopia in casi selezionati | 49,4% (142) | np | np |
| Altro (specificare) | 1,4% (4) | 11,2% (27) | 1,0% (1) |
| Quesito: Viene eseguita una valutazione ulteriore nei "casi critici"? | | | nd |
| Si | 71,5% (209) | 74,1% (180) | |
| No | 28,5% (83) | 25,9% (63) | |
| Quesito: Eseguite una CQI per ECMU? | | | |
| Si | 78,5% (226) | 75,9% (183) | 96,0% (66) |
| No | 21,5% (62) | 24,1% (58) | 4,0% (3) |
| Quesito: Eseguite una VEQ per ECMU? | | | |
| Si | 64,0% (184) | 59,8% (144) | 77,0% (53) |
| No | 36,0% (104) | 40,2% (97) | 23,0% (16) |
| Quesito: Partecipate ad un programma di VEQ sulla microscopia urinaria? | | | np |
| Si | | | |
| No | 54,4% (154) | 56,6% (133) | |
| | 45,6% (129) | 43,4% (102) | |

np, non previsto; nd, dato non disponibile; ECMU, esame chimico e morfologico delle urine

La raccomandazione forte delle LG della fase preanalitica in merito alla raccolta del mitto intermedio della prima minzione del mattino è rispettata in elevata percentuale (86,8%) così come quella che riguarda la disponibilità dell'informazione scritta sulle modalità di raccolta (poco meno del 70% dei laboratori). Le modalità di raccolta sono anche redatte in lingua inglese in una percentuale importante dei casi (68,6%), registrando un netto miglioramento rispetto al precedente sondaggio del 2016. Le istruzioni sono peraltro disponibili anche in altre lingue (31,4%): evidentemente la crescente utenza multietnica spinge ad un encomiabile adeguamento delle modalità di informazione.

Un buon progresso, rispetto ai precedenti questionari, si è rilevato rispetto ad un'altra raccomandazione forte (non solo Italiana) della fase preanalitica (1) e precisamente la valutazione della idoneità del campione (2,4), migliorando il dato del 2016 di 4 punti percentuali e il dato del 2009 di ben 25,9 punti percentuali.

Uno dei parametri preanalitici più critici nell'analisi delle urine è il tempo intercorrente tra la raccolta e la processazione del campione. È raccomandazione forte (2,5-9) che ECMU debba essere eseguito nel più breve tempo possibile e nel caso si preveda possano

trascorrere oltre quattro ore tra la raccolta del campione e l'esecuzione dell'esame, è raccomandata la conservazione dello stesso a +4–8°C; i dati raccolti nel 2019 e nel 2016 sono molto simili, buoni, ma senz'altro migliorabili.

Per quanto riguarda la raccolta effettuata utilizzando un contenitore standard e provette sottovuoto, entrambe le procedure evidenziano un miglioramento rispetto al 2016 e al 2009, rispettivamente del 4% e del 10% ma non possono essere ancora considerate soddisfacenti perché il mancato utilizzo di contenitori di buona qualità (ottenibili anche a basso costo) in grado di prevenire la manipolazione e la conseguente contaminazione del campione, non trova oggi una ragionevole giustificazione. In riferimento al monitoraggio del tempo e della temperatura di trasporto del campione urinario, le risposte positive, sebbene indichino un miglioramento di circa 6 punti percentuali rispetto al sondaggio del 2016, rimangono ancora deludenti, non raggiungendo il 30% dei partecipanti.

Le raccomandazioni della fase post analitica (3) considerano non necessari alcuni parametri che tradizionalmente venivano refertati, ma che alla luce di nuove acquisizioni tecnologiche e di una visione moderna, più clinicamente orientata dell'ECMU, possono essere esclusi dalla refertazione. Nello specifico per ECMU non sono raccomandate, anche

internazionalmente, le determinazioni di glucosio, chetoni, bilirubina e urobilinogeno (10-12). Alla domanda *“Quali di questi parametri chimici determinate, considerati “non necessari” dalle recenti LG?”* solo il 25% (99 partecipanti) ha dichiarato di “non refertare” nessuno dei parametri indicati, indice del fatto che ancora nei laboratori italiani permane una certa resistenza nell’innovare l’esame dell’urine, eliminando i parametri non necessari con la percezione errata che la “non refertazione” di questi parametri risulti un impoverimento delle informazioni cliniche, mentre in realtà si tratta di un miglioramento a favore di parametri più informativi.

Discorso analogo vale per il colore delle urine per il quale è raccomandata la valutazione solo qualora esso sia alterato, e per l’aspetto per il quale non è raccomandata la refertazione in quanto tutti gli elementi che lo determinano vengono valutati quale frazione corpuscolata nell’esame morfologico. Questi parametri infatti vengono ancora refertati da circa il 90% dei laboratori.

La presenza di ascorbato nelle urine è piuttosto frequente potendo originare sia dalla dieta (agrumi, conservanti alimentari) sia dall’assunzione di farmaci con vitamina C e rappresenta per il laboratorio un utile indicatore di possibili interferenze con la determinazione della emoglobina, dei nitriti, della bilirubina e del glucosio. Come da raccomandazione, alcune aziende hanno predisposto strisce reattive con una area dedicata alla sua rilevazione (13-14), ma solo il 30% dei laboratori lo determina e lo referta.

Uno dei parametri “irrinunciabili” fortemente raccomandati dalle LG della fase analitica è la concentrazione urinaria (densità relativa, conduttività o osmolalità) quale indice dello stato di idratazione e della capacità del rene di gestire l’equilibrio idro-elettrolitico, utilizzando un metodo che non risenta della presenza di altri soluti (ad esempio glucosio e proteine) (15-17). Di fatto solo il 64,9% dei partecipanti ha dichiarato di determinare la concentrazione urinaria, con una quota non sottovalutabile (35,1%) che non la determina. Tale dato lascia alquanto perplessi e merita attenzione: se fosse confermato sarebbe una grave perdita di qualità dell’esame dell’urine nel suo complesso.

Secondo le LG per la fase analitica la determinazione dell’albumina urinaria dovrebbe essere effettuata con un metodo molto sensibile e il risultato espresso in rapporto a indicatori di concentrazione urinaria quali la creatinina, permettendo, attraverso la normalizzazione, una valutazione più attendibile del risultato e in linea con le esigenze cliniche. In ordine di preferenza vengono raccomandati quale esame di prima scelta nell’adulto, il rapporto Albumina/Creatinina (Albumin/Creatinine Ratio, ACR) e il rapporto Proteine/Creatinina (PCR) in età pediatrica. La minor sensibilità di ACR nei soggetti in età pediatrica è determinata dalla maggiore frequenza, in questa fascia di età, di patologie tubulari rispetto a quelle glomerulari (18-22). Malgrado l’importanza del dato, ACR non viene determinato dalla stragrande maggioranza dei

laboratori (>80% dei partecipanti).

Per la valutazione del sedimento, la maggior parte dei laboratori utilizza l’analisi microscopica automatizzata (50% circa), seguita dalla citofluorimetria (26%) e dall’acquisizione di immagini (21%). Come atteso in seguito alla adozione dell’analisi automatizzata del sedimento, molti laboratori (20%, in aumento rispetto al 14% del 2016) non centrifugano le urine. Le risposte (114 in totale) che riguardano la velocità di centrifugazione sono discordanti tra di loro ed evidenziano l’equivoco tra la velocità di centrifugazione intesa come numero giri per minuto (RPM-rivoluzioni per minuto) e la Forza Centrifuga Relativa (RCF). Anche le risposte relative alle modalità di eliminazione del surnatante rilevano scarsa omogeneizzazione di comportamenti e rispecchiano tutta l’imprecisione del metodo manuale operatore-dipendente. Infatti il surnatante è ancora eliminato prevalentemente (53,7%) per capovolgimento veloce delle provette, trascurando la possibilità di aspirarlo e di uniformare la quantità di sedimento in tutte le urine, mantenendo costante il rapporto tra la porzione corpuscolata e quella liquida residua nel fondo della provetta nei diversi campioni.

Sicuramente dovrà aumentare la consapevolezza che la dotazione in laboratorio di microscopi a contrasto di fase e a luce polarizzata è essenziale per un corretto riconoscimento di tutti quegli elementi corpuscolati “critici” che altrimenti sfuggirebbero o sarebbero classificati in modo non corretto portando a mancate o scorrette diagnosi. Attualmente infatti il microscopio a contrasto da fase è presente in circa il 60% dei laboratori, mentre il microscopio a luce polarizzata è presente in meno del 40%, dati molto simili e quindi non in miglioramento rispetto a quelli del 2016.

La domanda circa la strategia analitica adottata dal Laboratorio e le relative risposte (Tabella 4) sono rivelatrici della scelta operata in base alla propria dotazione strumentale, alla numerosità dei campioni esaminati, alla casistica e all’assetto complessivo del laboratorio riflettendo rispetto al 2016 e al 2009 l’incremento dell’automazione nei laboratori italiani raccomandato dalle LG.

La partecipazione ai programmi di CQI e VEQ (78% e 64%, rispettivamente) rimane ancora appannaggio di una percentuale non soddisfacente di laboratori pur con un modesto aumento rispetto al 2016. Da registrare che nel 2009 le percentuali di partecipazione erano più alte, probabilmente perché quel questionario era stato proposto ai partecipanti al convegno “Urinalysis”; le risposte rappresentavano quindi un campione maggiormente sensibile alle tematiche trattate. Rimangono stabili rispetto al 2016 i dati sulla partecipazione a programmi di VEQ specifici per la microscopia urinaria (55% circa). I programmi di VEQ per l’analisi della frazione corpuscolata delle urine sono meno diffusi rispetto ai programmi di VEQ per l’analisi chimica, quantitativa o semi quantitativa delle urine, ma devono essere considerati estremamente importanti non solo in quanto permettono una valutazione delle competenze specifiche ma anche perché si configurano

come una vera e propria didattica a distanza su casi clinici concreti.

Da sei anni il GIAU collabora con i suoi membri, fornendo consulenza al Centro di Ricerca Biomedica (CRB) della Regione Veneto nella VEQ per la microscopia urinaria. La morfologia urinaria infatti ancora oggi rimane l'ambito di maggiore criticità, a causa del fatto che le potenzialità diagnostiche dell'analisi sono ancora sottovalutate e non appieno riconosciute, da cui purtroppo deriva una minore attenzione ai requisiti tecnici e di competenza professionale necessari.

I dati ricavati nel 2019 in merito alla fase di refertazione sono risultati confortanti e migliorati rispetto al 2016 (Tabella 5) sia nell'esplicitare le unità di misura che nell'esprimere commenti interpretativi, mentre rimangono stabili le percentuali relative alla refertazione degli ambiti di riferimento e al giudizio di idoneità dei campioni. I risultati dell'esame chimico dell'ECMU nel 2019 sono espressi prevalentemente in "concentrazione" (65,0%) confermando i dati del 2016; ma lascia una certa perplessità la constatazione che il 20,0% dei partecipanti ancora oggi esprima i dati qualitativamente, contrariamente a

Tabella 5

Risultati del questionario 2019 relativi alle domande sulla fase postanalitica; sono riportati per confronto i risultati dei due questionari precedenti (2016 e 2009).

| | 2019, % (n) | 2016, % (n) | 2009, % (n) |
|---|---------------|-------------|-------------|
| Quesito: Nel referto riportate le metodiche utilizzate? | | | np |
| Si | 46,5% (135) | 42,5% (93) | |
| No | 53,5% (155) | 57,5% (137) | |
| Quesito: Nel referto sono presenti le unità di misura? | | | np |
| Si | 96,0% (279) | 94,9% (225) | |
| No | 4,0% (15) | 5,1% (11) | |
| Quesito: Come sono espressi i risultati dell'esame Chimico dell'ECMU | | | np |
| Qualitativo | 20,0% (55) | 18,6% (39) | |
| Scala ordinale | 15,0% (41) | 18,0% (40) | |
| Concentrazione | 65,0% (177) | 63,4% (151) | |
| Quesito: Nel referto sono indicati gli ambiti di riferimento? | | | np |
| Si | 91,0% (251) | 92,6% (217) | |
| No | 9,0% (31) | 7,4% (18) | |
| Quesito: Come sono espressi i risultati del sedimento? | | | |
| Scala ordinale | 8,0% (22) | 13,1% (30) | 6,0% (4) |
| Elementi/microlitro | 38,6,0% (107) | 40,6 % (92) | |
| Elementi per campo microscopico | 53,4% (148) | 46,3% (112) | 94,0% (65) |
| Quesito: Nel referto sono presenti note sulla idoneità del campione? | | | np |
| Si | 59,6% (171) | 56,6% (130) | |
| No | 40,4% (116) | 43,4% (102) | |
| Quesito: Nel referto sono previsti commenti interpretativi? | | | np |
| Si | 63,5% (183) | 60,3% (139) | |
| No | 36,5% (105) | 39,7% (94) | |
| Quesito: Viene risolta la discrepanza per indicatori dello stesso parametro (es. Emoglobine ed Emazie)? | | | |
| Si | 45,5% (127) | 54,1% (131) | 73,0% (50) |
| No | 54,5% (152) | 45,9% (100) | 27,0% (19) |
| Quesito: Se Si come? | | nd | np |
| osservazione microscopica | 61,2 % (60) | | |
| correzione del dato a mano o applicando un fattore di conversione | 10,2% (10) | | |
| inserimento di note esplicative | 10,2% (10) | | |
| ripetizione dell'esame | 10,2% (10) | | |
| studio del caso e valutazione di tutti i parametri | 8,2% (8) | | |

np, non previsto; nd, dato non disponibile; ECMU, esame chimico e morfologico delle urine

quanto indicato nelle LG (3) che raccomandano l'espressione di tutti i parametri chimici, con l'eccezione di pH e nitriti, in concentrazione. Anche per quanto riguarda la refertazione del sedimento è raccomandato di esprimere in termini di concentrazione parametri irrinunciabili e di indubbia importanza quali emazie, leucociti, cellule epiteliali, cilindri (3). Per quest'ultimo dato, nel 2019 si registra un miglioramento rispetto al 2016 in quanto scendono di circa 5 punti percentuali coloro che utilizzano una scala ordinale nel refertare il sedimento, (modalità desueta da abbandonare), a favore di coloro che refertano in maniera corretta, numero di elementi/microlitro o numero di elementi/campo microscopico-HPF (High Power Field) (3).

Una domanda rilevante ha riguardato il possibile riscontro di una discrepanza per indicatori dello stesso parametro (ad esempio presenza di emoglobina ed emazie, positività all'esterasi e presenza di leucociti) tra l'esame chimico e i corrispettivi morfologici. Relativamente ai comportamenti assunti in queste circostanze, che sono tutt'altro che rare, le risposte sono talvolta apparse incomplete o non interpretabili in tanti casi, come spesso capita con le domande "aperte"; di fatto si sono registrate solo 98 risposte utili su 127, dimostrando, come del resto nel 2016, che anche in questo ambito è necessaria un'opera di sensibilizzazione. La revisione attenta del sedimento al microscopio è la reazione più frequente (60% circa) dell'operatore di fronte ad una discordanza ed è anche quella che risolve la maggior parte dei casi, associandola eventualmente ad altre analisi biochimiche e al sospetto diagnostico.

Il questionario realizzato dopo la pubblicazione delle linee guida delle fasi pre-, analitica e post-analitica, ha evidenziato rispetto al passato un notevole miglioramento in alcuni ambiti dell'ECMU mentre per altri si osservano ampi spazi di miglioramento.

Molti dei limiti riscontrati dipendono talvolta dalla disponibilità di presidi adeguati, come i microscopi a contrasto di fase e a luce polarizzata, o di contenitori standardizzati sottovuoto o di strumenti per il controllo delle temperature di trasporto e conservazione dei campioni. Un altro elemento che sicuramente influenza l'aderenza alle linee guida è la durata delle gare di fornitura dei laboratori pubblici che rende di fatto molto difficile modificare i dispositivi utilizzati prima della scadenza del contratto di fornitura in essere.

Si assiste tuttavia ad una certa resistenza al cambiamento come nel caso della mancata abolizione di quei parametri che vengono ancora determinati e refertati solo per abitudini radicate e non per reale necessità, come un colore e un aspetto normali o il glucosio, la bilirubina e l'urobilinogeno.

Anche i termini utilizzati nel referto dell'ECMU sono spesso superati e non al passo con l'innovazione. Ad esempio, la concentrazione è ancora troppo spesso definita "peso specifico", la velocità della centrifuga espressa come RPM anziché RCF, oppure i parametri chimici espressi in maniera qualitativa.

La consapevolezza della necessità di avere a disposizione un esame moderno, essenziale, aderente al quesito clinico ma non ridondante, dovrebbe indurre allo sfortimento di parametri desueti e alla valorizzazione dei parametri fondamentali, sanciti dalle LG disponibili.

In conclusione, è auspicabile che gli esiti di questo studio stimolino tutti i laboratoristi a proseguire il percorso intrapreso per dotare l'ECMU dei requisiti necessari ad una corretta diagnosi delle malattie dell'apparato urinario con il supporto delle società scientifiche di laboratorio e cliniche, e del GIAU, che dovrebbero orientare i propri programmi formativi ed educativi su quei temi che hanno mostrato maggiori carenze, nella ricerca di un miglioramento continuo nella pratica quotidiana dell'esame urinario, in tutte le sue numerose accezioni.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i Soci SIBioC e SIPMeL che hanno risposto al questionario e tutti i componenti del GIAU in particolare il Dott. Gianluca Gessoni anima e corpo delle precedenti elaborazioni dei questionari.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Manoni F, Caleffi A, Gessoni G, et al. L'esame delle urine chimico morfologico e colturale: proposta di linee guida per una procedura standardizzata della fase preanalitica. *Biochim Clin* 2011;35:131-9
2. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al. Esame Fisico, Chimico e Morfologico delle Urine: proposta di linee guida per la fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU). *Biochim Clin* 2016;4:353-82.
3. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al. Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: raccomandazioni per la fase postanalitica del Gruppo Interdisciplinare Laboratorio e Clinica Apparato Urinario (GIAU). *Biochim Clin* 2020;44:86-99.
4. Morandini M. Criteri di qualità per l'accettabilità dei campioni. *RIMeL-IJLaM* 2006;2:32-41.
5. ECLM - European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:1-96.
6. Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN). Management of suspected bacterial urinary tract infection in adults. A National Clinical Guideline. Edinburgh (Scotland);: SIGN publication 2006. <http://www.sign.ac.uk/our-guidelines/management-of-suspected-bacterial-urinary-tract-infection-in-adults/> (ultimo accesso: marzo 2021).
7. Fromm P, Bieganiec B, Ehenrich Z et al. Stability of common analytes in urine refrigerated for 24h before automated analysis by test strips. *Clin Chem* 2000;46:1384-6.
8. Eriksson I, Lindemann R, Thore M. Microbiological evaluation of a commercial transport system for urine samples. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:325-35.
9. European Committee for Standardization. In vitro diagnostic system: transport packages for medical and biological specimens. Bruxelles: CEN, 1996

- <https://www.sis.se/en/produkter/health-care-technology/laboratory-medicine/ssen829/> (ultimo accesso: marzo 2021).
10. Brunzel NA. Fundamentals of urine & body fluid analysis. London: Elsevier, 2013.
 11. Mundt L, Shanahan K. Graff's textbook of urinalysis and body fluids. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
 12. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care 2015;38 Suppl 1:S1-94.
 13. Mc Bride L. Textbook of urinalysis and body fluids: a clinical approach. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.
 14. Ross D, Neely A. Textbook of urinalysis and body fluids. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1982.
 15. Manoni F, Fornasiero L, Ercolin M et al. Laboratory diagnosis of renal failure: urine conductivity and tubular function. Minerva Urol e Nefrol 2009; 61:17-20.
 16. Wang JM, Wen CY, Lin CY et al. Evaluating the performance of urine conductivity as screening for early stage chronic kidney disease. Clin Lab 2014;60:635-43.
 17. Fazil Marickar YM. Electrical conductivity and total dissolved solids in urine. Urol Res 2010;38:233-5.
 18. KDIGO Clinical practice guideline for acute kidney injury. Kidney Int Supplements. 2012; Suppl 1.
 19. Ruggenenti P, Porrini E, Motterlini N et al. Measurable urinary albumin predicts cardiovascular risk among normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. J Am Soc Nephrol 2012;3:1717-24.
 20. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). J Hypertens 2013;31:1281-357.
 21. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio della malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. Biochim Clin 2015;39:617-26.
 22. Graziani M, Caldini A per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL Diabete Mellito. Indicazioni per la misura dell'albumina nelle urine per l'accertamento e il monitoraggio della nefropatia diabetica. Biochim Clin 2011;35:127-130.

Sistema Nazionale di Allerta Precoce, una piattaforma web per il contrasto alla diffusione delle Nuove Sostanze Psicoattive

Maria Rosaria Vari¹, Simona Zaami², Roberta Pacifici¹, Simona Pichini¹, Paolo Berretta¹, Michele Sciotti¹, Roberta Tittarelli², Nunzia La Maida², Anastasio Tini², Enrico Marinelli², Eleonora Buscaglia³, Elena Brambilla³, Giulia Scaravaggi³, Carlo A. Locatelli³, Francesco P. Busardò⁴, Marco Cavallo⁵, Silvia Graziano¹

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

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

³Centro Antiveleni e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Pavia

⁴Dipartimento di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

⁵Direzione Centrale per i Servizi Antidroga, Roma

ABSTRACT

The National Early Warning System, a web-based platform to prevent the spread of New Psychoactive Substances.

Introduction: the abuse of New Psychoactive Substances (NPS) has been a major issue since the 1990s, due to the significant impact this phenomenon has on the society and public health. The Italian legislation, in line with the European legislation, is aimed to limit the NPS use in the Country through different intervention strategies.

Methods: the Department for Anti-Drug Policies (DPA) of the Presidency of the Council of Ministers, has activated in Italy the National Early Warning System (SNAP) on NSP reporting, aimed at the early detection of potentially health-threatening phenomena related to the appearance of NPSs in the market. A second aim of the SNAP is the promotion of the technical-analytical expertise of laboratories for the detection of these substances.

Since June 2016, the DPA, where the National Focal Point (NFP) for the verification of the phenomenon of drug dependence is established, has entrusted the coordination of SNAP with the National Centre for Addiction and Doping (NCAD) of the "Istituto Superiore di Sanità". The Centre works with several partners, including the Pavia Poison Control Centre for clinical toxicology, the Unit of Forensic Toxicology of Sapienza University of Rome for bio-toxicological aspects, and the Central Directorate for Anti-Drug Services for national coordination of seizures operated by law enforcement agencies. To implement this network of collaboration, the NCAD has developed and activated a strategic 'web application' that simplifies the collection of information across the Country, optimizing incoming/outgoing reports between all the involved authorities.

Results: the analysis of the information collected on NPS during 2020 through the SNAP platform, highlighted the circulation of 47 NSPs in Europe, including two synthetic cannabinoids with potential public health risks and the emergence of NPS belonging to the class of benzodiazepines and the benzimidazole family.

Conclusions: The SNAP is an important tool for identifying and notifying the spread of NSPs in our Country very rapidly.

Parole Chiave: nuove sostanze psicoattive, sistema nazionale di allerta precoce, centro nazionale dipendenze e doping

INTRODUZIONE

La comparsa delle Nuove Sostanze Psicoattive (NSP) (1) sul mercato illecito delle sostanze stupefacenti

nell'Unione Europea (UE) e sul territorio italiano sta rappresentando, negli ultimi anni, una seria minaccia per la salute pubblica.

Definite inizialmente "legal highs" (droghe legali) o

Corrispondenza a: Maria Rosaria Vari, Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma, E-mail mariarosaria.vari@iss.it

Ricevuto: 04.03.2021

Revisionato: 05.04.2021

Accettato: 12.04.2021

Publicato on-line: 17.05.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.028

“smart drugs” (droghe furbe), le NSP sono molecole strutturalmente e farmacologicamente correlate a sostanze psicoattive illegali, ma ne rappresentano un’alternativa legale (2). Alla fine degli anni '90 in Europa il fenomeno delle NSP appariva limitato ad un numero esiguo di sostanze, circolanti per lo più negli ambienti dei “rave party” e dei festival di musica elettronica. In meno di vent’anni, la produzione e la vendita di queste sostanze hanno avuto un incremento esponenziale grazie alla globalizzazione, all’evoluzione dell’e-commerce e alla loro crescente popolarità.

Utilizzate per lo più a scopo ricreazionale, per i loro effetti stimolanti, empatogeni, entactogeni, euforizzanti e allucinogeni, la loro assunzione avviene spesso in combinazione con altre sostanze lecite (benzodiazepine, tabacco, bevande isotoniche, alcol) o illecite (3) (droghe classiche come cocaina, eroina, *Cannabis*) generando un pericoloso fenomeno di poliassunzione (4) dal quale possono derivare gravissimi rischi per la salute degli utilizzatori. Queste nuove modalità di consumo, sempre più spesso correlabili ad eventi occasionali e di svago, distaccandosi dai meccanismi classici delle dipendenze, vanno a delineare profili di rischio molto elevati soprattutto tra i giovanissimi, determinando un abbassamento della percezione del pericolo per la propria salute e facilitando sempre di più la diffusione di queste nuove sostanze percepite come “innocue” (5). A differenza delle tradizionali droghe d’abuso (come oppiacei, cocaina, *Cannabis*, amfetamine), i cui aspetti farmaco-tossicologici sono noti da tempo grazie ad un’ampia gamma di studi scientifici internazionali, le informazioni sul meccanismo d’azione, sulla tossicità e sul potenziale d’abuso di queste sostanze sono ancora molto limitate (6,7). Spesso è proprio l’utilizzatore a testare direttamente le proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche di queste sostanze (8) segnalandole attraverso “chat room” dedicate, cioè siti di messaggistica istantanea e forum telematici con scambio di informazioni sugli effetti prodotti (psiconauti).

La vasta offerta di NSP, sintetizzate *ex novo* o mediante modificazioni chimiche di molecole ad azione psicotropa preesistenti (“designer drugs”), concorre a rendere ancora più complessa l’osservazione e la comprensione di questo fenomeno. La messa in atto di adeguate azioni di prevenzione e di contrasto alla loro diffusione rappresenta, ad oggi, una vera e propria sfida per gli esperti del settore, sia dal punto di vista normativo che analitico.

Il carattere dinamico del fenomeno ha determinato, negli anni, progressive modifiche delle politiche di prevenzione, monitoraggio e contrasto del traffico di NSP nella UE. Il sistema legislativo europeo è stato, infatti, modificato ed emendato più volte, sia a livello nazionale che centrale, con l’obiettivo di creare un sistema normativo più veloce ed efficace a contenere l’indiscriminata diffusione di queste sostanze e a bandirne la vendita e la circolazione (9,10).

Per questo motivo, nel 1997, su proposta del Consiglio Europeo, fu realizzato un Sistema di Allerta

Precoce (Early Warning System, EWS) per lo scambio rapido di informazioni sulle NSP tra gli Stati Membri dell’UE, allo scopo di facilitare la loro identificazione e di offrire una rapida valutazione dei rischi correlati al loro consumo (97/396/JHA) (11). Con successiva Decisione del Consiglio Europeo (2005/387/JHA del 10 maggio 2005), l’Agenzia Europea per le Droghe (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction - EMCDDA) ha fornito indicazioni a tutti gli Stati Membri di istituire dei propri Sistemi Nazionali di Allerta sulle NSP (12,13). I Sistemi Nazionali di Allerta Precoce presentano strutture o componenti diversi a seconda delle esigenze e delle priorità del singolo Paese, pur rispondendo comunque alle necessità del sistema europeo. Attualmente, l’EWS è composto da una rete multicomponente e pluridisciplinare, che comprende l’EMCDDA, 30 Punti Focali Nazionali (PFN) [28 Stati membri dell’UE, più Turchia e Norvegia, l’Ufficio Europeo di Polizia (Europol), l’Agenzia Europea per i Medicinali (EMA), la Commissione Europea e altri partner]. L’EMCDDA, in collaborazione con l’Europol, è responsabile della raccolta, del confronto, dell’analisi e della valutazione dei dati provenienti dalla rete REITOX (Réseau Européen d’Information sur les Drogues et les Toxicomanies; www.emcdda.europa.eu), costituita dai PFN situati negli Stati Membri dell’UE, nei Paesi candidati e presso la Commissione Europea. REITOX divulga poi le informazioni ai vari partner della rete, al fine di fornire tutte le indicazioni necessarie alla prima fase di allerta precoce (14). I Sistemi Nazionali di Allerta Precoce dei vari paesi europei si differenziano per molti aspetti, tra i quali si possono elencare, la base giuridica, la posizione all’interno del governo (in organismi sanitari o preposti all’applicazione della legge), la portata (locale, regionale o nazionale) e le risorse ad essi destinate.

In linea con gli altri Stati Membri, in Italia, recependo la Decisione del Consiglio Europeo 2005/387/JHA, nel 2009, fu istituito il PFN (15) presso l’ufficio tecnico scientifico della direzione del Dipartimento Politiche Antidroga (DPA) della Presidenza del Consiglio dei Ministri. La struttura raccoglie i dati relativi alle sostanze stupefacenti nel Paese, attraverso i propri canali nazionali, e li riporta, attraverso la rete REITOX, (il network per lo scambio di informazioni sulle sostanze stupefacenti in Europa), all’EMCDDA a Lisbona e trasmette al proprio network nazionale, le segnalazioni ricevute dall’EMCDDA.

I diversi Sistemi Nazionali si distinguono anche per composizione e funzionamento: ad esempio alcuni Sistemi di Allerta Rapida si basano in modo significativo sulle scienze forensi e su reti di tossicologia, altri monitorano campioni raccolti dagli utilizzatori, altri ancora sono collegati a meccanismi di risposta rapida (16). In Italia, il Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP) è finalizzato ad individuare precocemente sia i fenomeni potenzialmente pericolosi per la salute pubblica, correlati alla comparsa di NSP sul territorio nazionale, ma anche alla comparsa di nuove modalità di consumo riguardanti le droghe classiche, quali eroina,

cocaina, amfetamina e tetraidrocannabinolo (THC) (ad esempio variazioni nella concentrazione del principio attivo, utilizzo di adulteranti, comparsa di nuove modalità di consumo).

Sostanzialmente il ruolo dello SNAP italiano, è fornire informazioni in materia di sostanze psicoattive, il più celermente possibile, agli attori principali della prevenzione e del contrasto su tutto il territorio nazionale e di promuovere le conoscenze tecnico-analitiche per l'individuazione precoce di NSP sul territorio nazionale. Dal marzo 2017, il DPA e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) cooperano nel progetto esecutivo finalizzato all'organizzazione e alla gestione evoluta del Sistema di Allerta Precoce denominato SNAP-ISS, affidando al Centro Nazionale Dipendenze e Doping (CNDD) il coordinamento pratico (17).

Scopo di questo lavoro, è analizzare i dati raccolti sulle NSP nel corso del 2020, grazie alla piattaforma SNAP; tali dati hanno evidenziato come la diffusione delle NPS mostri una tendenza in costante aumento a livello nazionale ed europeo con conseguente modifica delle modalità di consumo e con ripercussioni sulla salute pubblica imprevedibili.

METODI

Per la diffusione delle informazioni di nuove NSP, il CNDD ha realizzato e attivato una nuova piattaforma informatica, che semplifica la raccolta delle informazioni sul territorio nazionale, raccogliendo, gestendo e ottimizzando le segnalazioni in entrata/uscita sia dall'EMCDDA che dai centri collaborativi (network nazionale) presenti su tutto il territorio italiano. I 264 Centri Collaborativi (Tabella 1) sono costituiti da enti di varia tipologia, quali: le Unità di Urgenza ed Emergenza degli ospedali di tutto il territorio nazionale con o senza laboratori di analisi annessi, i Servizi per le Tossicodipendenze, i Laboratori delle Dogane e delle Forze di Polizia (laboratori dei Reparti Investigazioni Scientifiche dell'Arma Carabinieri, e del Servizio Polizia Scientifica della Polizia di Stato) e infine i Dipartimenti di Tossicologia Forense e Medicina Legale di numerose Università sparse su tutto il territorio nazionale. La piattaforma prevede la gestione di diversi profili operativi che, associati ad ogni utente, ne definiscono l'interazione attraverso ruoli e funzionalità specifiche (coordinatori, segnalatori, destinatari). Per la piena funzionalità della piattaforma, il CNDD si avvale della consulenza e dell'operatività di tre unità di supporto, ognuna competente e responsabile del coordinamento di un'area specifica:

- il Centro Antiveleni (CAV) degli Istituti Clinici Scientifici Maugeri di Pavia per il coordinamento degli aspetti clinico-tossicologici, compresi i casi di intossicazione acuta da NSP avvenuti sul territorio nazionale, attraverso la raccolta e la condivisione di informazioni medico-sanitarie (come ad esempio segni e sintomi all'ingresso in pronto soccorso, anamnesi, esito degli accertamenti tossicologici,

outcome del paziente);

- l'Unità di Ricerca di Tossicologia Forense dell'Università Sapienza di Roma per il coordinamento nazionale degli aspetti biotossicologici attraverso la gestione e la preparazione di protocolli analitici da inviare ai Centri Collaborativi, ai laboratori di farmaco-tossicologia e ai laboratori ospedalieri (urgenza-emergenza di secondo livello) per la determinazione quali/quantitativa delle sostanze in campioni non biologici e in matrici biologiche, convenzionali e non convenzionali, di eventuali soggetti intossicati;
- la Direzione Centrale per i Servizi Antidroga (DCSA) del Dipartimento della Pubblica Sicurezza, che coordina le attività di contrasto delle Forze di Polizia nel settore degli stupefacenti, per le informazioni sui sequestri di NSP, ovvero di stupefacenti di cui al DPR 309/90 (18), che possono costituire una minaccia alla salute dei consumatori.

Le attività della piattaforma si basano su due flussi di informazioni: uno in entrata rappresentato dalle segnalazioni ricevute dal sistema da parte

Tabella 1

Numero dei Centri Collaborativi Nazionali suddivisi per regione

| Regione | Centri Collaborativi |
|-----------------------|----------------------|
| Lombardia | 40 |
| Emilia Romagna | 28 |
| Veneto | 23 |
| Lazio | 21 |
| Puglia | 19 |
| Toscana | 18 |
| Piemonte | 17 |
| Marche | 17 |
| Campania | 17 |
| Sicilia | 16 |
| Liguria | 10 |
| Umbria | 8 |
| Trentino Alto Adige | 6 |
| Abruzzo | 6 |
| Calabria | 5 |
| Sardegna | 4 |
| Valle d'Aosta | 3 |
| Friuli Venezia Giulia | 3 |
| Basilicata | 2 |
| Molise | 1 |

Tabella 2*Attività della piattaforma. Flusso di comunicazione in entrata*

| Flusso in entrata | | |
|----------------------------|---|---|
| Tipologia di comunicazione | Comunicazioni EMCDDA | Comunicazioni Centri collaborativi e FF.PP. |
| Attività | Informazioni su molecola/e sequestrata/e in uno o più stati EU o intossicazioni/decessi in uno o più stati EU. | Informazioni su molecola sequestrata o intossicazioni/decessi su territorio nazionale o nuove forme di taglio o purezza di droghe classiche. |
| Destinatari | Dipartimento delle Politiche Antidroga della Presidenza del Consiglio dei Ministri, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, AIFA, Centri collaborativi. | Dipartimento delle Politiche Antidroga della Presidenza del Consiglio dei Ministri, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, AIFA, Centri collaborativi. |

EMCDDA, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; FF.PP., Forze di Polizia; EU, European Union; AIFA, Agenzia Italiana del Farmaco

Tabella 3*Attività della piattaforma. Flusso di comunicazione in uscita*

| Flusso in uscita | | | | | | |
|--|---|--|---|---|--|--|
| Reporting Form per EMCDDA | Informativa | Pre-Allerta | Allerta | | | |
| Informazione su nuove molecole sequestrate sul territorio nazionale e intossicazioni per NSP individuate per la prima volta sul territorio nazionale | Trasmissione di comunicazioni provenienti dall'EMCDDA o da altre strutture accreditate, diffusibili solo al network degli esperti e dei centri collaborativi e FF.PP. | Avviso alle strutture competenti che hanno la responsabilità di intervento, affinché siano pronte ad attivare le procedure di risposta indicate dal sistema. | Azione coordinata tra tutte le strutture competenti secondo modalità concordati | | | |
| | | | Grado 1 Rischio di disagio sociale (preoccupazioni, ansie, condizioni di allarme sociale) | Grado 2 Rischio di lievi danni per la salute (disturbi temporanei non potenzialmente letali). Rischio di diffusione di sostanze nel mercato illecito | Grado 3 Rischio concreto di gravi danni per la salute (malattie invalidanti, mortalità) | |
| EMCDDA, DPA | DPA, Centri Collaborativi, FF.PP., Min. Salute, AIFA | DPA, Min. Salute, AIFA, Centri Collaborativi, FF.PP., Ser.D. e Comunità, Dipartimenti emergenza/urgenza | DPA, Min. Salute, AIFA, Centri Collaborativi, FF.PP., Ser.D. e Comunità, Dipartimenti emergenza/urgenza | | | |

EMCDDA, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; NSP, nuove sostanze psicoattive; FF.PP., Forze di Polizia; DPA, Dipartimento per le Politiche Antidroga; AIFA, Agenzia Italiana del Farmaco; Ser.D., Servizi per le Tossicodipendenze

dell'EMCDDA, dal network dei Centri Collaborativi e dai sequestri effettuati dalle Forze di Polizia sul territorio nazionale (Tabella 2) e uno in uscita costituito da documenti che vengono diramati dallo SNAP ai diversi attori destinatari (DPA, Ministero della Salute, Centri Collaborativi, Forze di Polizia) (Tabella 3). In questo modo tutte le segnalazioni europee/italiane confluiscono in un unico contenitore, fruibile online dai soggetti accreditati, offrendo la possibilità ad essi di effettuare ricerche mirate, anche geo-localizzate, tramite diverse chiavi di ricerca, ad esempio per struttura chimica, per tipo di sostanza e/o per sintomatologia clinica, rendendo così più efficaci gli interventi di primo soccorso.

Al fine di rendere poi disponibili tali informazioni ai destinatari, le segnalazioni vengono elaborate dalle tre unità operative di supporto, che di comune accordo stabiliscono il tipo di documento da produrre, supervisionandolo, ciascuno per le proprie specifiche competenze. I documenti del flusso in uscita appartengono a 2 diverse tipologie, dirette verso specifici destinatari:

- le Informative e le Comunicazioni EMCDDA, prive di carattere di urgenza sanitaria, sono documenti diffusi a tutti i Centri Collaborativi per la condivisione delle informazioni analitiche e cliniche sulle NSP identificate su territorio nazionale o europeo;

- le Allerte hanno carattere di urgenza sanitaria e sono ulteriormente differenziate in 3 gradi (grado 1, grado 2 e grado 3) a seconda della gravità del fenomeno segnalato e delle sue conseguenze sulla salute e sono diffuse a tutti i Centri Collaborativi, alle Forze dell'Ordine, agli Assessorati alla Sanità, ai Servizi Territoriali per le Tossicodipendenze, alle Unità di Emergenza/Urgenza e ai Dipartimenti specifici del Ministero della Salute:

- allerta di grado 1, quando il fenomeno è connesso a un rischio di disagio sociale (preoccupazione, ansia, condizioni di allarme sociale);
- allerta di grado 2, quando il fenomeno è connesso a un rischio di lievi danni per la salute (intossicazioni non potenzialmente letali) e ad un pericolo di diffusione della sostanza identificata nel mercato illecito;
- allerta di grado 3, quando esiste un rischio concreto di gravi danni per la salute (intossicazioni acute potenzialmente letali, decessi).

Inoltre, lo SNAP è responsabile della trasmissione all'EMCDDA, mediante "Reporting Form", delle NSP rinvenute per la prima volta sul territorio nazionale da sequestri e/o casi di intossicazione acuta e/o decessi e dell'elaborazione dei pareri per l'aggiornamento delle tabelle presenti nel DPR n. 309/90 (18), su richiesta del Ministero della Salute.

Nell'ambito dello SNAP, il CNDD è responsabile di un circuito inter-laboratorio (NPS-LABVEQ) per la valutazione della qualità nella determinazione delle NSP e delle sostanze d'abuso classiche (19) e/o metaboliti in matrici biologiche convenzionali e non convenzionali (20), per verificare le prestazioni dei laboratori a scopo educativo e di crescita collettiva di tutto lo SNAP (21,22). Tutti i 63 laboratori dei Centri Collaborativi aderenti al network SNAP sono dotati di standard di riferimento delle NSP più diffuse nell'ultimo biennio, per la caratterizzazione delle sostanze ritenute maggiormente presenti nel mercato telematico e clandestino causative di intossicazioni acute e croniche per gli assuntori su tutto il territorio europeo.

RISULTATI

Grazie a questo sistema, le segnalazioni in ingresso registrate dallo SNAP nel corso del 2020 sono state 208 suddivise tra 65 notifiche dall'EMCDDA, 136 segnalazioni dalle Forze di Polizia, 1 segnalazione dall'Interpol e 6 segnalazioni dai restanti Centri Collaborativi (3 dall'Agenzia delle Dogane, 1 dall'Università, 1 dalle Tossicologie Forensi e 1 dai Dipartimenti d'Urgenza). Le segnalazioni hanno riguardato un totale di 138 NSP, di cui 47 segnalate sul territorio europeo (Tabella 4) e 91 segnalate sul territorio nazionale (Tabella 5) con alcune sovrapposizioni. A queste si aggiungono le sostanze classiche quali THC, eroina, morfina, cocaina, amfetamina, metamfetamina, Ecstasy (MDMA), metorfano, acido lisergico (LSD) presenti nelle segnalazioni provenienti dal territorio nazionale. Lo SNAP ha trasmesso all'EMCDDA 31 Reporting Form, riguardanti

40 NSP individuate per la prima volta sul territorio italiano a seguito di sequestri e/o casi di intossicazione acuta e/o decessi. I Reporting Form hanno riguardato: 5 molecole appartenenti alle classi dei catinoni sintetici, 7 degli oppioidi sintetici, 7 dei cannabinoidi sintetici, 5 delle indolalchilammine, 3 delle fenetilammine, 1 delle aricicloesilammine, 2 delle arilalchilammine, 3 delle benzodiazepine, 1 delle piperidine, 1 delle piperazine e 5 della classe di altre sostanze. Fra queste, una NSP appartenente alla classe degli oppioidi sintetici (isobutirfentanil) (Figura 1) è stata individuata per la prima volta su territorio europeo proprio in Italia (SNAP 23/20).

I documenti destinati ai Centri Collaborativi prodotti dallo SNAP sono stati 53 suddivisi tra 27 informative, 12 comunicazioni, 5 allerte di grado 1, 5 allerte di grado 2 e 4 allerte di grado 3.

A seguito delle segnalazioni ricevute, seguendo la procedura operativa per l'attivazione delle misure di sicurezza per la salute concordata tra il CNDD e il Ministero della Salute, sono stati elaborati pareri per l'aggiornamento delle Tabelle presenti nel DPR n. 309/90 (18) riguardanti 75 molecole appartenenti alla classe degli oppioidi sintetici (n = 11), dei cannabinoidi sintetici (n = 10), delle fenetilammine (n = 2), dei catinoni sintetici (n = 10), delle benzodiazepine (n = 4), delle indolalchilammine (n = 11), delle aricicloesilammine (n = 3), delle arilalchilammine (n = 5), delle piperazine (n = 1), delle piperidine (n = 2), delle pirrolidine (n = 1), degli aminoindani (n = 1), delle sostanze vegetali (n = 3) e della classe di altre sostanze (n = 11).

DISCUSSIONE

Il quadro che si delinea attraverso la lettura trasversale delle informazioni raccolte, mostra come il fenomeno delle NSP stia diventando, anche in Italia, un problema di sanità pubblica affiancandosi e, spesso, sovrapponendosi, anche in termini di utilizzo contemporaneo di più sostanze, a quello delle droghe tradizionali. I segnali che emergono, confermano una trasformazione del mercato che si rivolge sempre più verso le sostanze sintetiche, il poliutilizzo e

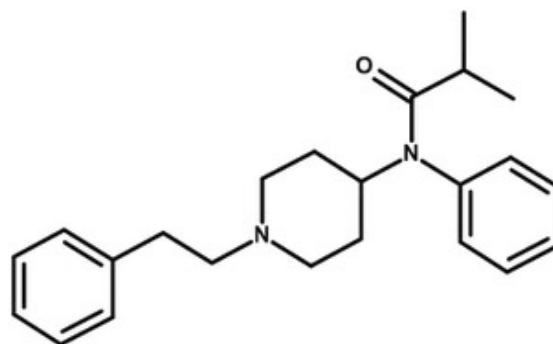


Figura 1
Struttura chimica della molecola isobutirfentanil.

Tabella 4

Nuove Sostanze Psicoattive segnalate dall'EMCDDA nel 2020

| Oppioidi | Informativa | Pre-Allerta | Allerta |
|-------------------|--|-----------------------|--|
| Etazene | α -pirrolidinocicloesilfenone (α -PCYP) | N-metil-triptamina | BENZYL-4CN-BINACA |
| Brorfina | 3F- α -PHP | 5-Br-DMT | CUMIL-CBMINACA |
| Metodesnitazene | 4F-3-metil- α -PVP | 5-CI-DMT | PTI-3 |
| Isobutirfentanil | N, N-dietilpentilone | 5-MeO-DBT | Cumil-CB-MeGaClone |
| Nortilidina | MDPHiP | MALT | 4F-MDMB-BICA |
| Metonitazene | 3F-N-etilesedrone | | 5F-EMB-PICA |
| Carbonil-bromadol | 3-clorocatinone | | 5F-EDMB-PICA |
| AP-238 | 2-metiletilbufedrone (2-MEB) | | Cumil-BC-HpMeGaClone-221 |
| O-AMKD | | | 4F-ABINACA |
| Fluonitazene | | Aminoindani | 5B-AKB48 |
| | | 5-MeO-AI | CUMIL-NBMICA |
| Arilalchilammine | Arilcicloesilammine | Altri | Pirrolidine |
| BOH-PHP | Metossipropamina | Nefiracetam | 4,4-dimetil-1-fenil-1-pirrolidin-1-il-pentan-3-one |
| BOH-2C-B | 3F-PCP | Citicolina | |
| Mefedrene | Metossisopropamina | Clozapina | |
| M-ALPHA-HCMA | | 3-metossifenmetrazina | |

AP-238, 4-cinnamil-2,6-dimetil-1-propionil-piperazina; O-AMKD, 3-(4-acetil-1-metilpiperidin-4-il) fenil acetato; BOH-PHP, 1-fenil-2-(pirrolidin-1-il)esan-1-olo; BOH-2C-B, 2-ammino-1-(4-bromo-2,5-dimetossifenil)etanolo; M-ALPHA-HCMA, 3-(2H-1,3-benzodiossol-5-il)-2-idrossi-N,2-dimetil-3-(metilammino) propanammide; 3F- α -PHP, 1-(3-fluorofenil)-2-(pirrolidin-1-il)esan-1-one; 4F-3-metil- α -PVP, 1-(4-fluoro-3-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-one; MDPHiP, 1-(1,3-benzodiossol-5-il)-4-metil-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; 3F-PCP, 1-[1-(3-fluorofenil)cicloesil]piperidina; 5-Br-DMT, [2-(5-bromo-1H-indol-3-il)etil]dimetilammina; 5-CI-DMT, [2-(5-cloro-1H-indol-3-il)etil]dimetilammina; 5-MeO-DBT, N-butyl-N-[2-(5-metossi-1H-indol-3-il)etil]butan-1-ammina; MALT, N-[2-(1H-indol-3-il)etil]-N-metilprop-2-en-1-ammina; 5-MeO-AI, 5-metossi-2,3-diidro-1H-inden-2-ammina; BENZYL-4CN-BINACA, N-benzil-1-(4-cianobutil)-1H-indazol-3-carbossammide; CUMIL-CBMINACA, 1-(Ciclobutilmetil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-1H-indazol-3-carbossammide; PTI-3, N-({2-[1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-1,3-tiazol-4-il}metil)-2-metossi-N-metiletanammide; Cumil-CB-MeGaClone, 5-(ciclobutilmetil)-2-(1-metil-1-fenil-etil)pirido[4,3-b]indol-1-one; 4F-MDMB-BICA, metil 2-[[1-(4-fluorobutil)indol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; 5F-EMB-PICA, etil 2-[[1-(5-fluoropentil)indol-3-carbonil]ammino]-3-metil-butanoato; 5F-EDMB-PICA, etil 2-(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-carbossammido)-3,3-dimetilbutanoato; Cumil-BC-HpMeGaClone-221, (5-(Biciclo[2.2.1]ept-2-il)metil)-2-(2-fenilpropan-2-il)-2,5-diidro-1H-pirido[4,3-b]indol-1-one; 4F-ABINACA, N-(adamantan-1-il)-1-(4-fluorobutil)-1H-indazol-3-carbossammide; 5B-AKB48, N-(1-adamantil)-1-(5-bromopentil)indazol-3-carbossammide; CUMIL-NBMICA, N-[(1-fenil-1-metil)etil]-1-(2-norbornil)metil-1H-indol-3-carbossammide;

Tabella 5

Nuove Sostanze Psicoattive segnalate sul territorio nazionale nel 2020

| Oppioidi | Catinoni | Indolalchilammine | Cannabinoidi sintetici |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------|
| 2-metil-AP-237 | Eutilone | 4-AcO-DMT | 4F-MDMB-BICA |
| 3-metilfentanil | 3-MMC | 4-AcO-MET | 4F-MDMB-BINACA |
| Butirilfentanil | 4-Cl-alfa-PVP | 4-HO-DET | 5F-Cumyl-PeGaClone |
| Carfentanil | 4-CMC (clefedrone) | 4-HO-MET | 5F-EDMB-PICA |
| Fentanil | alpha-PHiP | 4-HO-MIPT | 5F-EMB-PICA |
| Furanilfentanil | alpha-PHP | 5-Meo-DALT | 5F-MDMB-PICA |
| Acetilfentanil | BMDP | 5-Meo-DMT | 5F-MDMB-PINACA (5F-ADB) |
| Metossiacetilfentanil | Bupropione | 5-MeO-MIPT | CL-2201 (5F-JWH-398) |
| Ocfentanil | MDPHP | DMT | CUMYL-PeGACLoNE |
| THF-F (tedraidrofuranilfentanil) | Mefedrone | DPT | 5C-AKB48 (5CI-APINACA) |
| Tramadolo | MMMP | | JWH-122 |
| | 3-CMC | | JWH-210 |
| | NEP | | MDMB-4en-PINACA |
| | N-etilesedrone | | |
| Fenetilammine | Arilcicloesilammine | Altro | Piante |
| 2-FEA | 2-fluorodescloroketamina (2-FDCK) | 1cP-LSD | Armina |
| 3-FEA | 3-HO-PCE | 1P-LSD | Ibogaina - Voacanga africana |
| 2C-B | 3-HO-PCP | 3-FPM | Mitraginina (KRATOM) |
| 25E-NBOMe | 3-MeO-PCE | Efenidina | Psilocina |
| DOC | 3-MeO-PCP | GHB | Salvia divinorum-salvinorina |
| 2-FMA | Descloro-N-etilketamina (O-PCE) | NOOPEPT | Scopolamina |
| 4-FMA | Ketamina | OSTARINA | Atropina |
| Metallilescalina | Metossipropamina (MXPr) | Phenibut | |
| Arilalchilammine | Benzodiazepine | Piperazine | Piperidine |
| 2C-B-Fly | Bromazolam | NSI-189 | Isopropilfenidato |
| 6-APB | Clonazolam | | 4F-MPH |
| Mefedrene | Etizolam | | |
| 5-MAPB | Flualprazolam | | |
| | Flunitrazolam | | |

2-metil-AP-237, 1-[2-metil-4-(3-fenilprop-2-en-1-il)piperazin-1-il]butan-1-one; 2-FEA, 2-fluoroetamfetamina; 3-FEA, 3-fluoroetamfetamina; 2C-B, 2-(4-bromo-2,5-dimetossifenil)etanammina; 25E-NBOMe, 2-(2,5-dimetossi-4-etilfenil)-N-(2-metossibenzi)etanammina; DOC, 1-(4-cloro-2,5-dimetossifenil)propan-2-ammina; 2-FMA, 1-(2-fluorofenil)-N-metilpropan-2-ammina; 4-FMA, 4-fluoro-N, α -dimetil-benzeetanammina; 2C-B-Fly, 2-(8-bromo-2,3,6,7-tetraidrofuro[2,3-f][1]benzofuran-4-il)etanammina; 6-APB, 1-(1-benzofuran-6-il)propan-2-ammina; 5-MAPB, 1-(1-benzofuran-5-il)-N-metilpropan-2-ammina; 3-MMC, 2-(metilammino)-1-(3-metilfenil)propan-1-one; 4-Cl-alfa-PVP, 1-(4-clorofenil)-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; alpha-PHiP, 4-metil-1-fenil-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; alpha-PHP, α -pirrolidinoesifenone; BMDP, 2-Benzilammino-1-(3,4-metilenediossifenil)propan-1-one; MDPHP, 1-(1,3-benzodiossol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)esan-1-one; MMMP, 2-metil-1-(4-(metil)fenil)-2-morfolinopropan-1-one; 3-CMC, 3-clorometcatinone; NEP, N-etilpentedrone; 3-OH-PCE, 3-[1-(etilammino)cicloesil]fenolo; 3-HO-PCP, 3-(1-piperidin-1-ilcicloesil)fenolo; 3-MeO-PCE, N-etil-1-(3-metossifenil)cicloesanammina; 3-

Tabella 5

Continua

MeO-PCP, 1-[1-(3-metossifenil)cicloesil]piperidina; 4-AcO-DMT, 3-[2-(dimetilammino)etil]-1H-indol-4-il acetato; 4-AcO-MET, 3-[2-[etil(metil)ammino]etil]-1H-indol-4-il acetato; 4-HO-DET, 3-[2-(diethylammino)etil]-1H-indol-4-olo; 4-HO-MET, 3-[2-[etil(metil)ammino]etil]-1H-indol-4-olo; 4-HO-MIPT, 3-[2-[metil(1-metiletil)ammino]etil]-1H-indol-4-olo; 5-Meo-DALT, N-[2-(5-metossi-1H-indol-3-il)etil]-N-(prop-2-en-1-il)prop-2-en-1-ammina; 5-Meo-DMT, 2-(5-metossi-1H-indol-3-il)-N,N-dimetiletanamina; 5-MeO-MIPT, N-[2-(5-metossi-1H-indol-3-il)etil]-N-metilpropan-2-ammina; DMT, N,N-dimetiltriptamina; DPT, N,N-dipropiltriptamina; 1cP-LSD, N1-(ciclopropilmetanolo)-lisergic acid dietilammide; 1P-LSD, Dietilammide dell'acido 1-propionil-lisergico; 3-FPM, 2-(3-fluorofenil)-3-metilmorfolina; GHB, acido 4-idrossibutanoico; NOOPEPT, N-fenilacetil-L-prolilglicina etil estere; NSI-189, (4-benzilpiperazin-1-il)-[2-(isopentilammino)-3-piridil]metanone; 4F-MDMB-BICA, metil 2-[[1-(4-fluorobutil)indol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; 4F-MDMB-BINACA, metil 2-(1-(4-fluorobutil)-1H-indazol-3-carbossammide)-3,3-dimetilbutanoato; 5F-Cumyl-PeGaClone, 5-(5-fluoropentil)-2-(1-metil-1-fenil-etil)pirido[4,3-b]indol-1-one; 5F-EDMB-PICA, etil 2-(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-carbossammide)-3,3-dimetilbutanoato; 5F-EMB-PICA, etil 2-[[1-(5-fluoropentil)indol-3-carbonil]ammino]-3-metil-butanoato; 5F-MDMB-PICA, metil 2-[[1-(5-fluoropentil)indol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; 5F-MDMB-PINACA, metil 2-[[1-(5-fluoropentil)indazol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; CL-2201, 1-(5-fluoropentil)-3-(4-cloro-1-naftoil)indolo; CUMYL-PeGACLoNE, 2-(1-metil-1-fenil-etil)-5-pentil-pirido[4,3-b]indol-1-one; 5C-AKB48, N-(1-adamantil)-1-(5-cloropentil)indazol-3-carbossammide; JWH-122, (4-metil-1-naftil)-(1-pentilindol-3-il)metanone; JWH-210, (4-etil-1-naftil)-(1-pentilindol-3-il)metanone; MDMB-4en-PINACA, metil 3,3-dimetil-2-(1-(pent-4-en-1-il)-1H-indazol-3-carbossammide)butanoato; 4F-MPH, 4-fluorometilfenidate;

l'adulterazione delle sostanze. Nel 2020, le conseguenze sociali ed economiche della pandemia COVID-19 (23,24) hanno inoltre avuto un impatto più gravoso sulle popolazioni vulnerabili ed emarginate, che sono state anche quelle maggiormente esposte ai rischi dell'uso di tali sostanze.

Come riportato nei Risultati, nel corso del 2020, l'EMCDDA ha segnalato 47 nuove sostanze psicoattive, per lo più appartenenti alle classi degli oppioidi, dei catinoni e dei cannabinoidi sintetici (Tabella 6) e per tali sostanze insieme a quelle rilevate nei sequestri avvenuti sul territorio nazionale è stato espresso parere per l'aggiornamento delle Tabelle del DPR n. 309/90 (18) (Tabella 7).

A riprova dell'adattamento dei mercati, si può notare che le varie azioni e le restrizioni intraprese dagli Stati Membri nei riguardi dei fentanili ha portato alla segnalazione di 4 nuovi oppioidi appartenenti alla famiglia dei benzimidazoli. A questa famiglia appartengono l'etonitazene e il clonitazene (25), che sono sotto controllo internazionale, e l'isotonitazene, che è stato recentemente oggetto di un rapporto iniziale da parte dell'EMCDDA (26) e di una valutazione di rischio (27). Queste sostanze rappresentano una minaccia potenzialmente analoga ai fentanili per la salute pubblica. Nel panorama complessivo delle NSP, suscitano particolare attenzione anche due nuovi cannabinoidi sintetici, il MDMB-4en-PINACA (28) e il 4F-MDMB-BICA (29). Entrambe le sostanze sono monitorate con molta attenzione in Europa a causa dei potenziali ed elevati rischi per la salute pubblica, tanto che al momento sono al vaglio dell'Expert Committee on Drug Dependence per il controllo a livello internazionale. Oltre che ad un consumo fine a sé stesso delle due sostanze, negli ultimi mesi l'EMCDDA ha ricevuto un numero crescente di segnalazioni relative all'identificazione di MDMB-4en-PINACA in *Cannabis* a basso contenuto di THC (30). La diffusione di *Cannabis* adulterata è principalmente correlata alla necessità, per chi la commercializza, di amplificare l'effetto psicoattivo della *Cannabis* di scarsa qualità. Dal luglio 2020, diversi Stati Membri hanno segnalato questo tipo di

adulterazione; in alcuni casi tali prodotti adulterati sono stati associati ad intossicazioni acute con caratteristiche cliniche simili a quelle riportate per i cannabinoidi sintetici, come perdita di coscienza, sudorazione anomala, ansia, tremore e dolore al petto. Questi sintomi derivano dal processo di adulterazione che viene generalmente effettuato attraverso la nebulizzazione di un'apposita soluzione sulla matrice vegetale, non riuscendo quindi a garantire una distribuzione omogenea del cannabinoide adulterante. Anche in Italia, sono stati effettuati a Torino e a Milano diversi sequestri dalla Polizia di Stato che hanno rilevato il cannabinoide sintetico MDMB-4en-PINACA in *Cannabis* a basso contenuto di THC. Ad aggravare ulteriormente la situazione, è stata la comparsa di NSP appartenenti alla classe delle benzodiazepine. Alcuni di questi medicinali sono venduti come versioni contraffatte di ansiolitici comunemente prescritti come alprazolam (Xanax) e diazepam, altri sono venduti online, talvolta con le loro denominazioni proprie, e commercializzati come versioni "legali" di medicinali autorizzati. Lo SNAP ha ricevuto dall'EMCDDA un numero limitato ma preoccupante di segnalazioni di queste sostanze che sembrano essere state utilizzate anche come agenti neutralizzanti in casi di violenza sessuale (31) e che rappresentano un elevato rischio, specialmente se assunti in associazione con alcol o sostanze che deprimono i centri respiratori come i gabapentinoidi e gli oppiacei. Per questo motivo, lo SNAP ha provveduto a pubblicare un'allerta di grado 1 (Figura 2) riguardante questo fenomeno e le sostanze coinvolte come alprazolam, diazepam e temazepam. Per quanto riguarda invece, il panorama a livello nazionale, le benzodiazepine hanno rappresentato circa il 5,4% dei sequestri complessivi. I sequestri più significativi e importanti sono stati attribuiti alle categorie dei cannabinoidi sintetici (15,2%) e dei catinoni (15,2%). Subito a seguire, si sono collocati gli oppioidi sintetici e le indolalchilammine, con percentuali rispettivamente del 12% e del 10,9%. In percentuale, la tendenza è paragonabile a quella delle classi delle arilcicloesilammine (8,7%), di sostanze di altra natura (8,7%), delle fenetilammine (8,7%) e delle sostanze

vegetali (7,6%). Le percentuali più basse si sono, invece, registrate tra le classi delle arilalchilammine (4,3%), delle piperidine (2,2%) e delle piperazine (1,1%). Tutte le sostanze in questione sono state rinvenute per lo più nascoste all'interno di pacchi o lettere postali.

È quindi importante che il monitoraggio di modelli e tendenze riguardanti il consumo di NSP rappresenti una priorità dato che è ragionevole presumere che tali sostanze siano coinvolte nel gran numero di ospedalizzazioni droga-correlate in cui si fa riferimento a

sostanze miste o sconosciute.

Le segnalazioni del Centro Antiveneni di Pavia hanno progressivamente evidenziato un crescente numero di intossicazioni, sempre connesse alla circolazione di NSP sul territorio nazionale. Nel 2020 sono stati segnalati al sistema 23 casi accertati come positivi a una o più nuove sostanze (su 98 pazienti valutati, nonostante il COVID) mentre nel 2019 sono stati segnalati al sistema 27 casi accertati come positivi a una o più nuove sostanze (su 158 pazienti valutati).

Tabella 6

Nuove Sostanze Psicoattive appartenenti alle classi degli oppioidi, dei catinoni e dei cannabinoidi sintetici segnalate da EMCDDA nel 2020

| Classe | Sostanza | Provvedimento Giudiziario | Aspetto | Quantità | Luogo del ritrovamento | Data del ritrovamento | Notifica EMCDDA |
|----------|----------------------|---------------------------|---------------------------------------|----------|---|-----------------------|-------------------|
| Oppioidi | Etazene | Sequestro di polizia | Polvere di colore grigio | 0,078 gr | Polonia (in transito verso la Germania) | 31 marzo 2020 | 1 giugno 2020 |
| | Brorfina | Sequestro di polizia | Polvere | <0,05 gr | Svezia | 25 marzo 2020 | 4 giugno 2020 |
| | Metodesnitazene | Acquisto online di prova | Polvere di colore bianco | 1 gr | Belgio | 1 maggio 2020 | 26 giugno 2020 |
| | Isobutirfentanil | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 12,27 gr | Italia | 13 febbraio 2019 | 24 luglio 2020 |
| | Nortilidina | Sequestro di polizia | 2 compresse di colore bianco | - | Polonia | 26 maggio 2020 | 30 luglio 2020 |
| | Metonitazene | Acquisto di prova | Polvere di colore giallo/beige | 1 gr | Germania | 26 giugno 2020 | 14 settembre 2020 |
| | Carbonil-bromadolo | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco/giallognolo | 5 gr | Germania | 1 luglio 2020 | 15 ottobre 2020 |
| | AP-238 | Acquisto di prova | Polvere di colore bianco | 1 gr | Germania | 13 luglio 2020 | 22 ottobre 2020 |
| | O-AMKD | Acquisto di prova | Polvere | 0,5 gr | Germania | Aprile 2020 | 27 ottobre 2020 |
| Catinoni | Fluonitazene | Acquisto online di prova | Polvere di colore bianco-beige | 5 gr | Germania | 13 luglio 2020 | 7 dicembre 2020 |
| | α-PCYP | Sequestro doganale | Polvere di colore beige/bianco sporco | 5 gr | Svezia | 20 novembre 2019 | 9 gennaio 2020 |
| | 3F-α-PHP | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 1 gr | Svezia | 27 novembre 2019 | 28 gennaio 2020 |
| | 4F-3-metil-α-PVP | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 1,02 gr | Svezia | 27 febbraio 2020 | 30 aprile 2020 |
| | N,N-dietilpentilone | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 401,5 gr | Spagna | 15 aprile 2019 | 13 luglio 2020 |
| | MDPHIP | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 0,8 gr | Svezia | 5 giugno 2020 | 19 agosto 2020 |
| | 3F-N-etilesedrone | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 2,84 gr | Svezia | 11 maggio 2020 | 20 ottobre 2020 |
| | 3-clorocatinone | Sequestro doganale | Polvere di colore bianco | 15 gr | Germania | 15 giugno 2020 | 13 novembre 2020 |
| | 2-metiletilbufedrone | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 1,43 gr | Svezia | 18 settembre 2020 | 20 novembre 2020 |

Tabella 6
Continua

| | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--|---------|---|------------------|-------------------|
| Cannabinoidi sintetici | Benzil-4CN-BINACA | Sequestro doganale | Materiale di natura vegetale | 0,48 gr | Svezia | 25 novembre 2019 | 3 marzo 2020 |
| | CUMYL-CBMINACA | Acquisto di prova | Materiale di natura vegetale | 2 gr | Germania | 17 febbraio 2020 | 6 maggio 2020 |
| | Cumyl-CB-MeGaClone | Sequestro di polizia | Materiale di natura vegetale | 0,46 gr | Ungheria | 17 marzo 2020 | 30 giugno 2020 |
| | 4F-MDMB-BICA | Sequestro doganale | Polvere di colore bianco | 1,5 kg | Belgio (dalla Cina verso i Paesi Bassi) | 31 marzo 2020 | 2 luglio 2020 |
| | 5F-EMB-PICA | Sequestro doganale | Polvere di colore bianco | 2 kg | Belgio (dalla Cina verso i Paesi Bassi) | 3 marzo 2020 | 3 luglio 2020 |
| | 5F-EDMB-PICA | Sequestro di polizia | Materiale di natura vegetale di colore marrone | 0,19 gr | Ungheria | 6 agosto 2020 | 8 settembre 2020 |
| | Cumyl-BC-HpMeGaClone-221 | Acquisto di prova | Materiale di natura vegetale | 12 gr | Germania | 31 luglio 2020 | 30 settembre 2020 |
| | 4F-ABINACA | Sequestro di polizia | Polvere di colore bianco | 1,4 gr | Svezia | 30 luglio 2020 | 9 ottobre 2020 |
| | 5B-AKB48 | Acquisto di prova online | Polvere di colore giallo-marrone | 5 gr | Slovenia | 1 settembre 2020 | 14 dicembre 2020 |
| | CUMYL-NBMICA | Sequestro doganale | Polvere | 300 gr | Germania | 2019 | 23 dicembre 2020 |

AP-238, 4-cinnamil-2,6-dimetil-1-propionil-piperazina; O-AMKD, 3-(4-acetil-1-metilpiperidin-4-il)fenil acetato; α -PCYP, α -pirrolidinocloesifenone; 3F- α -PHP, 1-(3-fluorofenil)-2-(pirrolidin-1-il)esan-1-one; 4F-3-metil- α -PVP, 1-(4-fluoro-3-metilfenil)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-one; MDPHIP, 1-(1,3-benzodiossol-5-il)-4-metil-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; BENZYL-4CN-BINACA, N-benzil-1-(4-cianobutil)-1H-indazol-3-carbossammide; CUMIL-CBMINACA, 1-(Ciclobutilmetil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-1H-indazol-3-carbossammide; Cumil-CB-MeGaClone, 5-(ciclobutilmetil)-2-(1-metil-1-fenil-etil)pirido[4,3-b]indol-1-one; 4F-MDMB-BICA, metil 2-[[1-(4-fluorobutil)indol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; 5F-EMB-PICA, etil 2-[[1-(5-fluoropentil)indol-3-carbonil]ammino]-3-metil-butanoato; 5F-EDMB-PICA, etil 2-(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-carbossammide)-3,3-dimetilbutanoato; Cumil-BC-HpMeGaClone-221, (5-(Biciclo[2.2.1]ept-2-il)metil)-2-(2-fenilpropan-2-il)-2,5-diidro-1H-pirido[4,3-b]indol-1-one; 4F-ABINACA, N-(adamantan-1-il)-1-(4-fluorobutil)-1H-indazol-3-carbossammide; 5B-AKB48, N-(1-adamantil)-1-(5-bromopentil)indazol-3-carbossammide; CUMIL-NBMICA, N-[(1-fenil-1-metil)etil]-1-(2-norbornil)metil-1H-indol-3-carbossammide; 5-MeO-AI, 5-metossi-2,3-diidro-1H-inden-2-ammina; 3-MeO-PCP, 1-[1-(3-metossifenil)cicloesil]piperidina;

Tabella 7

Nuove sostanze psicoattive per le quali è stato espresso parere per l'aggiornamento delle Tabelle del DPR n. 309/90 nel corso del 2020.

| Classe | Nome | Classe | Nome |
|-------------------|-------------------|--------|-----------------------|
| Indolalchilammine | N-metiltriptamina | Altro | Citolina |
| | 5-CI-DMT | | Nefiracetam |
| | 5-Br-DMT | | Ostarina |
| | 5-MeO-DMT | | NOOPEPT |
| | DPT | | 1P-LSD |
| | 5-MeO-DBT | | Fenilpiracetam |
| | 4-AcO-DMT | | Efenidina |
| | 4-HO-DET | | 3-FPM |
| | 4-AcO-MET | | 3-metossifenmetrazina |
| | 4-HO-MET | | Piracetam |
| | 5-MeO-DALT | | Phenibut |

Tabella 7

Continua

| Classe | Nome | Classe | Nome |
|------------------------|--------------------------|--------------------|--|
| Cannabinoidi sintetici | PTI-3 | Oppioidi | Isotonitazene |
| | 4F-MDMB-BICA | | Metodesnitazene |
| | 5F-EMB-PICA | | Brorfina |
| | 5F-EDMB-PICA | | Etazene |
| | JWH-210 | | Nortilidina |
| | 4F-ABINACA | | O-AMKD |
| | Cumyl-BC-HpMeGaClone-221 | | AP-238 |
| | CL-2201 (5F-JWH-398) | | Carbonil-bromadolo |
| | 5F-AMB-PINACA | | Metonitazene |
| | 5F-MDMB-PICA | | Benzodiazepine |
| Catinoni | 4-CMC | Flunitrazolam | |
| | N-etilesedrone | Clonazolam | |
| | N,N-dietilpentilone | Bromazolam | |
| | MDPHiP | Arlcicloesilammine | Metossipropamina (MXPr) |
| | BMDP | | 3-MeO-PCP |
| | Alfa-PHiP | | 3F-PCP |
| | 3-CMC | Piante | Armalina |
| | 4-CI-alfa-PVP | | Armina |
| | 3F-N-etilesedrone | | Tetraidroarmina |
| | 3-clorocatinone | | Fenetilammine |
| Arilalchilammine | BOH-2C-B | Metallilescalina | |
| | BOH-PHP | Piperidine | |
| | Mefedrene | | Isopropilfenidato |
| 5-MAPB | Piperazine | NSI-189 | |
| 2C-B-Fly | | Pirrolidine | 4,4-dimetil-1-fenil-1-pirrolidin-1-il-pentan-3-one |
| Aminoindani | 5-MeO-AI | | |
| Oppioidi | Crotonilfentanil | | |
| | Valerilfentanil | | |

5-Cl-DMT, [2-(5-cloro-1H-indol-3-il)etil]dimetilammina; 5-Br-DMT, [2-(5-bromo-1H-indol-3-il)etil]dimetilammina; 5-MeO-DMT, 2-(5-metossi-1H-indol-3-il)-N,N-dimetiletanammina; DPT, N,N-dipropiltriptamina; 5-MeO-DBT, N-butil-N-[2-(5-metossi-1H-indol-3-il)etil]butan-1-ammina; 4-AcO-DMT, 3-[2-(dimetilammino)etil]-1H-indol-4-il acetato; 4-HO-DET, 3-[2-(diethylammino)etil]-1H-indol-4-olo; 4-AcO-MET, 3-[2-[etil(metil)ammino]etil]-1H-indol-4-il acetato; 4-HO-MET, 3-[2-[etil(metil)ammino]etil]-1H-indol-4-olo; 5-MeO-DALT, N-[2-(5-metossi-1H-indol-3-il)etil]-N-(prop-2-en-1-il)prop-2-en-1-ammina; NOOPEPT, N-fenilacetil-L-prolilglicina etil estere; 1P-LSD, Dietilammide dell'acido 1-propionil-lisergico; 3-FPM, 2-(3-fluorofenil)-3-metilmorfolina; PTI-3, N-({2-[1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-1,3-tiazol-4-il}metil)-2-metossi-N-metiletanammina; 4F-MDMB-BICA, metil 2-[[1-(4-fluorobutil)indol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; 5F-EMB-PICA, etil 2-[[1-(5-fluoropentil)indol-3-carbonil]ammino]-3-metil-butanoato; 5F-EDMB-PICA, etil 2-(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-carbossammide)-3,3-dimetilbutanoato; JWH-210, (4-etil-1-naftil)-(1-pentilindol-3-il)metanone; 4F-ABINACA, N-(1-adamantil)-1-(4-fluorobutil)indazol-3-carbossammide; Cumil-BC-HpMeGaClone-221, (5-(Biciclo[2.2.1]ept-2-il)metil)-2-(2-fenilpropan-2-il)-2,5-diidro-1H-pirido[4,3-b]indol-1-one; CL-2201, 1-(5-fluoropentil)-3-(4-cloro-1-naftoil)indolo; 5F-AMB-PINACA, Metil 2-[[1-(5-fluoropentil)-1H-indazol-3-il]carbonil]ammino)-3-metilbutanoato; 5F-MDMB-PICA, metil 2-[[1-(5-fluoropentil)indol-3-carbonil]ammino]-3,3-dimetil-butanoato; 4-CMC, 4-Clorometcatinone; MDPHiP, 1-(1,3-benzodiossol-5-il)-4-metil-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; BMDP, 2-Benzilammino-1-(3,4-metilenediossifenil)propan-1-one; alpha-PHiP, 4-metil-1-fenil-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; 3-CMC, 3-clorometcatinone; 4-CI-alfa-PVP, 1-(4-clorofenil)-2-pirrolidin-1-il-pentan-1-one; BOH-2C-B, 2-ammino-1-(4-bromo-2,5-dimetossifenil)etanolo; BOH-PHP, 1-fenil-2-(pirrolidin-1-il)esan-1-olo; 5-MAPB, 1-(1-benzofuran-5-il)-N-metilpropan-2-ammina; 2C-B-Fly, 2-(8-bromo-2,3,6,7-tetraidrofuro[2,3-f][1]benzofuran-4-il)etanammina; O-AMKD, 3-(4-acetil-1-metilpiperidin-4-il)fenil acetato; AP-238, 4-cinnamil-2,6-dimetil-1-propionil-piperazina; 3F-PCP, 1-[1-(3-fluorofenil)ciclosil]piperidina; 2-FMA, 1-(2-fluorofenil)-N-metilpropan-2-ammina; 4F-MPH, 4-fluorometilfenidate; NSI-189, (4-benzilpiperazin-1-il)-[2-(isopentilammino)-3-piridil]metanone;



Unità di coordinamento
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



Governo Italiano
Dipartimento politiche antidroga
Presidenza del Consiglio dei Ministri

29/07/2020
Prot. S.N.A.P. 22/20

**AD USO INTERNO DEI CENTRI COLLABORATIVI DEL S.N.A.P.
VIETATE LA DIVULGAZIONE E LA PUBBLICAZIONE SU WEB**

Alla c.a.

Centri Collaborativi S.N.A.P.
Direzione Generale Prevenzione – Ministero della Salute
Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione – Ministero della Salute
Direzione Generale dei dispositivi medici, del Servizio Farmaceutico e della Sicurezza delle cure
Agenzia Italiana del Farmaco
Assessorati Regionali alla Sanità
Assessorati Regionali alle Politiche Sociali
Referenti regionali per le Tossicodipendenze
Servizi per le tossicodipendenze
Comunità terapeutiche
Unità mobili Croce Rossa Italiana
Unità di Emergenza Urgenza

Allerta di Grado 1:

- **Danni correlati al consumo di benzodiazepine "contraffatte" o "illecite"**

Viene di seguito riportata la segnalazione sul consumo di benzodiazepine che l'Osservatorio Europeo sulle Droghe e le Tossicodipendenze (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction- EMCDDA) ha trasmesso al Punto Focale Italiano nel mese di luglio 2020.

Supervisione tecnico scientifica della presente Comunicazione:
 R. Pacifici, S. Pichini, M.R. Vari – Istituto Superiore di Sanità, Centro Nazionale Dipendenze e Doping – Roma
 E. Marinelli - Università Sapienza, Unità di Tossicologia Forense
 F.P. Busardò – SOD Medicina Legale – Università Politecnica delle Marche
 C. Locatelli, E. Buscaglia, E. Brambilla, ICS Maugeri IRCCS Istituto Scientifico di Pavia, Centro Antiveneni – Pavia



Unità di Tossicologia Forense
Tel/Fax: +39 099121602

Coordinamento
Centri Collaborativi di Sanità



Tel/Fax: +39 06 49903110

Aspetti clinico-tossicologici



Centro Antiveneni di Pavia
Istituto Clinico Scientifico
Maugeri IRCCS
Pavia
Tel: +39 0382 24444

Pagina 1 di 7

Figura 2

Allerta di Grado 1 sulla classe delle benzodiazepine contraffatte.

Tali casi hanno riguardato 12 sostanze psicoattive appartenenti alla classe dei cannabinoidi sintetici (n=4), degli oppioidi sintetici (n=3), delle arilcicloesilammine (n=2), dei catinoni sintetici (n=2) e di benzodiazepine (n=1). Nella valutazione di questi dati è necessario tenere in considerazione che la tossicità di queste NSP è spesso molto elevata, inducendo avvelenamenti più spesso che assuefazioni. Per questo motivo, ha suscitato particolare allarme l'identificazione della sostanza bromazolam (32), individuata, per la prima

volta in Italia e in Europa, come concausa di un episodio di intossicazione acuta in un caso clinico, e ad oggi ancora non inclusa nelle Tabelle del DPR n. 309/90 (18), quindi a tutti gli effetti considerata una sostanza legale. Oltre al bromazolam, nel corso del 2020, sono stati trasmessi all'EMCDDA, 31 Reporting Form sulle NSP individuate per la prima volta sul territorio italiano a seguito di sequestri, intossicazione o decessi, con una prevalenza per le classi degli oppioidi e dei cannabinoidi sintetici.

Un cenno di particolare rilievo va dedicato al compito che il CNDD, nell'ambito dello SNAP, assolve per l'elaborazione di pareri richiesti, da parte del Ministero della Salute, per l'aggiornamento delle Tabelle presenti nel DPR n. 309/90 (18). In funzione delle segnalazioni di nuove molecole identificate per la prima volta in Europa, o in sequestri effettuati in Italia, il Ministero della Salute procede all'avvio dell'istruttoria per l'aggiornamento delle Tabelle, richiedendo formalmente il parere tecnico di competenza all'ISS. Se tale parere identifica la sostanza come psicoattiva e capace di indurre dipendenza, l'ISS trasmette, con relazione di accompagnamento, il parere al Consiglio Superiore di Sanità che ne valuta l'eventuale inserimento in una delle 4 Tabelle del DPR n. 309/90 (18). Per le sostanze aventi attività farmacologica e terapeutica deve esserne anche valutato l'inserimento nella Tabella dei medicinali stupefacenti. Il Decreto Ministeriale di aggiornamento delle Tabelle viene quindi pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana e inserito nella successiva edizione della Farmacopea ufficiale. Nel corso del 2020, il CNDD ha elaborato pareri per l'aggiornamento delle Tabelle presenti nel DPR n. 309/90 (18) riguardanti 75 molecole (Tabella 7) appartenenti maggiormente alla classe degli oppioidi sintetici (n=11), dei cannabinoidi sintetici (n=10), dei catinoni sintetici (n=10), delle indolalchilammine (n=11) e delle altre sostanze (n=11). A seguire i pareri hanno interessato le classi delle fenetilammine (n=2), delle benzodiazepine (n=4), delle arilalchilammine (n=3), delle arilalchilammine (n=5), delle piperazine (n=1), delle piperidine (n=2), delle pirrolidine (n=1), degli aminoindani (n=1) e delle sostanze vegetali (n=3). In questo scenario appare evidente come l'identificazione e lo sviluppo di tecniche di analisi efficaci siano di prioritaria importanza per tenere il passo con la fluidità di un mercato così dinamico, dove nuove sostanze compaiono in tempi brevissimi producendo tuttavia importanti conseguenze sanitarie. Nell'ambito del circuito inter-laboratorio (NPS-LABVEQ) per la determinazione di NSP, le metodologie sviluppate sono state condivise e quelle che hanno dimostrato maggiore fattibilità, applicabilità e robustezza sono state consigliate per l'analisi di queste sostanze. A ciò, si è affiancata la possibilità di disporre di una biblioteca di standard specifici e aggiornati per la caratterizzazione di queste sostanze.

Grazie alla rete cooperativa nazionale ed europea, lo SNAP costituisce, dunque, un importante strumento che permette di identificare in tempi sempre più ridotti le NSP in circolazione sul nostro territorio, dove, ad oggi, la prevenzione resta l'arma più efficace.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato sostenuto dalla Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento delle Politiche Antidroga, Roma.

Si ringraziano Giampiero Mazzi, Vincenzo Natale e Marco Tallon per il supporto informatico continuo, senza

il quale la piattaforma non potrebbe funzionare. Per il supporto tecnico si ringraziano Laura Martucci, Simonetta di Carlo e Antonella Bacosi.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. Direttiva (UE) 2017/2103 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 novembre 2017. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017L2103&from=IT> (ultimo accesso: gennaio 2021).
2. Pacifici R, Berretta P, Pellegrini M, et al. Diffusione e penetrazione sociale dell'uso di sostanze psicoattive o psicotrope. In: Prevenzione, Giovani e... Come Investire Nella Formazione Scolastica per La Salute. Edizioni Goliardiche; 2019:199-237.
3. Pacifici R, Zuccaro P, Farré M, et al. Effects of repeated doses of MDMA ("Ecstasy") on cell-mediated immune response in humans. *Life Sci* 2001;24:2931-41.
4. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Relazione Annuale Sull'evoluzione Del Fenomeno Della Droga Nell'Unione Europea ed in Norvegia. Ufficio Lussemburgo: Ufficio delle pubblicazioni ufficiali delle Comunità europee; 2002. http://www.federserd.it/files/download/oedt_rapporto_2002_0458_IT.pdf (ultimo accesso: gennaio 2021).
5. Santacroce R, Martinotti G, Lupi M, et al. Epidemiologia dell'uso delle nuove sostanze psicoattive in un campione di adolescenti e giovani adulti: uno studio pilota. *Dipend Patologiche* 2013;1:5-8.
6. Richter LHJ, Herrmann J, Andreas A, et al. Tools for studying the metabolism of new psychoactive substances for toxicological screening purposes – A comparative study using pooled human liver S9, HepaRG cells, and zebrafish larvae. *Toxicol Lett* 2019;305:73-80.
7. Peters FT, Meyer MR. In vitro approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds. *Drug Test Anal* 2011;3:483-95.
8. Pantano F, Graziano S, Pacifici R, et al. New Psychoactive Substances: A Matter of Time. *Curr Neuropharmacol* 2019;17:818-822.
9. Vari MR, Mannocchi G, Tittarelli R, et al. New Psychoactive Substances: evolution in the exchange of information and innovative legal responses in the European Union. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:8704.
10. Rinaldi R, Bersani G, Marinelli E, et al. The rise of new psychoactive substances and psychiatric implications: A wide-ranging, multifaceted challenge that needs far-reaching common legislative strategies. *Hum Psychopharmacol* 2020;35:e2727.
11. Hughes B, Griffiths P. Regulatory approaches to new psychoactive substances (NPS) in the European Union. *Addiction* 2014;109:1591-3.
12. Council Decision 2005/387/JHA of 10 May 2005 on the Information Exchange, Risk-Assessment and Control of New Psychoactive Substances. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2005/387/oj> (ultimo accesso: gennaio 2021).
13. Zaami S. New psychoactive substances: concerted efforts and common legislative answers for stemming a growing health hazard. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*

- 2019;23:9681-90.
14. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Early Warning System on NPS. <https://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/eu-early-warning-system> (ultimo accesso: gennaio 2021).
 15. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Relazione Europea Sulla Droga 2019: Tendenze e Sviluppi. Ufficio delle pubblicazioni dell'Unione europea, Lussemburgo. 2019. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ITN_PDF.pdf (ultimo accesso: gennaio 2021).
 16. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Focus sulle droghe. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/645/EMCDDA_DiF22_IT_318771.pdf (ultimo accesso: gennaio 2021).
 17. Accordo di collaborazione interistituzionale DPA-ISS. Presidenza del Consiglio dei Ministri. 17. <http://www.politicheantidroga.gov.it/it/dpa-in-sintesi/attivita-e-progetti/accordi-e-protocolli-d-intesa/accordo-di-collaborazione-interistituzionale-dpa-iss/> (ultimo accesso: gennaio 2021).
 18. Di Luca NM, Busardò FP, Pirani F, et al. Evolution of Italian laws banning trafficking, use and abuse of psychotropic drugs. *Ann Ist Super Sanita* 2020;56:76-89.
 19. Pichini S, Abanades S, Farré M, et al. Quantification of the plant-derived hallucinogen Salvinorin A in conventional and non conventional biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry after *Salvia divinorum* smoking. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:1659-66.
 20. Graziano S, Anzillotti L, Mannocchi G, et al. Screening methods for rapid determination of new psychoactive substances (NPS) in conventional and non-conventional biological matrices. *J Pharm Biomed Anal* 2019;163:170-9.
 21. Accordo di collaborazione interistituzionale DPA-ISS (progetto NPS-LABVEQ). Presidenza del Consiglio dei Ministri. <http://www.politicheantidroga.gov.it/it/search/?cerca=NPS+LABVEQ> (ultimo accesso: gennaio 2021).
 22. Zaami S, Busardò FP, Pichini S, et al. The value of toxicological and forensic analyses in the global challenge to health risks caused by new psychoactive substances. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23:6008-10.
 23. Vari MR, Berretta P, Palmi I, et al. Drug market and drug addiction treatment during the COVID-19 pandemic. *Minerva Medicolegale* 2020;140:48-51.
 24. Zaami S, Marinelli E, Vari MR. New Trends of Substance Abuse During COVID-19 Pandemic: An International Perspective. *Front Psychiatry* 2020;11:700.
 25. Blanckaert P, Caninaert A, Van Uytvanghe K, et al. Report on a novel emerging class of highly potent benzimidazole NPS opioids: Chemical and in vitro functional characterization of isotonitazene. *Drug Test Anal* 2020;12:422-30.
 26. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). EMCDDA initial report on the new psychoactive substance N,N-diethyl-2-[[4-(1-methylethoxy)phenyl]methyl]-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine (isotonitazene). https://www.emcdda.europa.eu/publications/initial-reports/isotonitazene_en (ultimo accesso: gennaio 2021).
 27. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Report on the risk assessment of N,N-diethyl-2-[[4-(1-methylethoxy)phenyl]methyl]-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine (isotonitazene). https://www.emcdda.europa.eu/publications/risk-assessments/isotonitazene_en (ultimo accesso: gennaio 2021).
 28. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). EMCDDA technical report on the new psychoactive substance methyl 3,3-dimethyl-2-[[1-(pent-4-en-1-yl)-1H-indazole-3-carbonyl]amino]butanoate (MDMB-4en-PINACA). https://www.emcdda.europa.eu/publications/technical-reports/technical-report-mdmb-4en-pinaca_en (ultimo accesso: gennaio 2021).
 29. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). EMCDDA technical report on the new psychoactive substance methyl 2-[[1-(4-fluorobutyl)-1H-indole-3-carbonyl]amino]-3,3-dimethylbutanoate (4F-MDMB-BICA). https://www.emcdda.europa.eu/publications/technical-reports/technical-report-4f-mdmb-bica_en (ultimo accesso: gennaio 2021).
 30. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). EU Early Warning System Advisory. Risk of poisoning from cannabidiol (CBD) e-liquids adulterated with synthetic cannabinoids. <https://ednd2.emcdda.europa.eu/ednd/additionalResources/163> (ultimo accesso: gennaio 2021).
 31. Anderson LJ, Flynn A, Pilgrim JL. A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review. *J Forensic Leg Med* 2017;47:46-54.
 32. Hester Jr JB, Von Voigtlander P. 6-Aryl-4H-s-triazolo[4, 3-a][1,4] benzodiazepines. Influence of 1-substitution on pharmacological activity. *J Med Chem* 1979;22:1390-8.

Identificazione di positività al SARS-CoV-2 attraverso metodi di Machine Learning sui dati dell'esame emocromocitometrico: validazione esterna di modelli allo stato dell'arte

Anna Carobene¹, Andrea Campagner², Adela Sulejmani³, Valerio Leoni³, Michela Seghezzi⁴, Sabrina Buoro⁵, Federico Cabitza²

¹IRCCS Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, Milano

²DISCO, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano

³Laboratorio di chimica clinica, Ospedale di Desio e Monza, ASST-Monza, Dipartimento di medicina e chirurgia, Università di Milano-Bicocca, Monza

⁴Laboratorio di chimica clinica, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

⁵Centro regionale di riferimento per la qualità, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, quale Comunicazione Orale

ABSTRACT

Identification of SARS-CoV-2 positivity using machine learning methods on blood count data: external validation of state-of-the-art models.

Introduction: The aim of the paper is to present the results from the process of external validation of a number of machine learning (ML) models that had been previously developed to detect SARS-CoV-2 virus positivity on both symptomatic and asymptomatic patients on the basis of the complete blood count (CBC) test.

Methods: Briefly, models were trained using a dataset of 816 COVID-19 positive and 920 negative cases collected at the emergency departments of IRCCS Hospital San Raffaele and IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi. 21 parameters, including the results of the CBC analysis, age [60.9 (0.9) years], gender (57% males) and the presence of COVID-19 related symptoms were used. The validation regarded the evaluation of the error rate (through different metrics, including accuracy, sensitivity, specificity and the area under the curve (AUC)) of the models considered. This external validation was conducted on two well balanced datasets coming from two different hospitals in Northern Italy: Desio hospital and Bergamo Papa Giovanni XXIII hospital. 163 positive and 174 true negative patients from Desio, and 104 positive and 145 true negative from Bergamo were included in the validation.

Results: The performance of the predictive models is satisfactory as we can report an average AUC of 95% for both external datasets.

Conclusion: ML models have been applied to hematological parameters for a more rapid and cost-effective detection of the COVID-19 disease. We make the point that validated models may be useful in the management and early detection of potential COVID-19 patients.

Parole chiave: SARS-CoV-2, machine learning, emocromo

INTRODUZIONE

Dalla sua diffusione iniziale di un anno fa, la pandemia COVID-19 ha finora colpito oltre 110 milioni di persone e causato più di due milioni e mezzo di morti in tutto il mondo (1). La reazione a catena della polimerasi

inversa (PCR) e la trascrittasi inversa-PCR (rRT-PCR) sono i test di riferimento per la rilevazione del coronavirus SARS-CoV-2 che causa il COVID-19; entrambi tuttavia presentano carenze note, come lunghi tempi di risposta, costi elevati, tassi elevati di falsi negativi (fino al 15%), necessità di laboratori

Corrispondenza a: Anna Carobene, servizio Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milan, Telefono +39 02 26432850, E-mail carobene.anna@hsr.it

Ricevuto: 30.03.2021

Revisionato: 19.04.2021

Accettato: 21.04.2021

Pubblicato on-line: 09.06.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.033

specializzati e potenziale carenza di reagenti (2,3).

Diversi studi clinici (4-6) hanno mostrato come parametri ematochimici avrebbero potuto rappresentare una più veloce e più economica potenziale alternativa per una rapida diagnosi di COVID-19 se utilizzati in modelli di apprendimento automatico (o Machine Learning, ML) (3).

L'utilizzo di dati ematochimici è quindi un approccio decisamente interessante se comparato ad altri metodi diagnostici alternativi, come la tomografia (TC) o radiografia del torace (7,8). Questi ultimi metodi sono infatti associati a prestazioni generalmente buone, ma anche a costi di transazione molto più elevati rispetto agli esami del sangue di routine (inclusa la logistica e la gestione dei pazienti), e con una minore sicurezza, non solo a causa dell'elevata quantità di dosi di radiazioni delle procedure TC, ma anche al rischio di contaminazione degli ambulatori di radiologia (9).

Sebbene il potenziale dei metodi ML per la diagnosi di COVID-19 sia elevato, solo pochi modelli sono stati sottoposti a convalida esterna. In pratica, eseguire la "validazione esterna" di un modello ML significa testare le prestazioni del modello su dati che sono stati raccolti da altri contesti rispetto a quelli coinvolti nel training e nella validazione interna del modello (10). In modo particolare, limitandoci principalmente a modelli ML costruiti su dati ematologici, tra decine di pubblicazioni, si possono citare solo le pubblicazioni riportate in bibliografia che riportano una procedura di validazione esterna: (11-15).

Inoltre, almeno a conoscenza degli autori, solo quattro studi sono associati ad uno strumento online (15-17) o ad un codice sorgente disponibile al pubblico (12)¹. La disponibilità di questi strumenti risulta condizione necessaria perché uno studio possa essere sottoposto ad una validazione cosiddetta "ecologica" (18), che riguarda cioè la rilevanza ed effettiva applicabilità di uno studio nel contesto clinico reale.

Questa mancanza di studi di validazione esterna è piuttosto sorprendente alla luce dell'importanza di poter fare affidamento su una diagnosi rapida ed economica per una malattia come la COVID-19 e alla luce del fatto che le recenti indagini (6,18) e linee guida di ML in medicina (19) hanno fortemente sostenuto la necessità di convalidare i modelli esternamente.

Al fine di colmare questa lacuna nella letteratura e per estendere il lavoro recentemente pubblicato (15), in questo contributo presentiamo il processo di validazione di 6 modelli ML che si basano sui soli dati dell'emocromo completo (CBC) originariamente raccolti presso l'Ospedale San Raffaele, Milano (Ospedale universitario da 1350 posti letto e 3400 dipendenti). I dati di validazione sono stati raccolti presso due diversi ospedali, l'ospedale di Desio e l'ospedale di Bergamo, (di 383 e 1080 posti letto, e distanti rispettivamente 25 e 54 chilometri dalla struttura precedente). I tre ospedali sono tutti in Lombardia, una delle regioni più colpite al mondo durante la prima ondata della malattia (20).

¹Gli autori di (12) rendono disponibile tramite piattaforma GitHub (<https://github.com/andrewsoltan/CURIAL-manuscript>) il codice sorgente Python utilizzato nello sviluppo del relativo modello di ML

METODI

Come riportato dalla recente pubblicazione di Cabtiza et al. (15), selezionandoli in base alle loro prestazioni, sono stati considerati 6 diversi modelli di ML: Random Forest (foresta casuale, RF), Logistic Regression (regressione logistica, LR), Support Vector Machine (macchina a vettori di supporto, SVM), k-Nearest Neighbors (kNN), Naive Bayes (NB) e un modello di combinazione (ensemble) dei 5 modelli precedentemente citati. Questi modelli sono stati addestrati, e internamente validati, su una serie di 21 parametri, inclusi i risultati dell'emocromo con conta differenziale ottenuti su analizzatore Sysmex XN9000, età, sesso (57% maschi) e la presenza di sintomi correlati a COVID-19 (SI/NO). L'elenco completo dei parametri utilizzati dai modelli di ML è mostrato nella Tabella 1; da notare che la conta differenziale dei leucociti utilizza i dati espressi sia in percentuale sia in valore assoluto. Per i dettagli completi dello sviluppo dei modelli si rimanda alla pubblicazione di Cabtiza et al. (15).

L'insieme di dati su cui sono stati costruiti i modelli di ML, comprendeva 816 casi COVID-19 positivi e 920 negativi, di pazienti afferenti al pronto soccorso (PS) dell'Ospedale San Raffaele (OSR) e dell'Istituto Ortopedico Galeazzi (IOG) nei mesi di Marzo e Aprile 2020.

Il protocollo dello studio (BIGDATA-COVID19) è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale San Raffaele in accordo con la dichiarazione di Helsinki, come emendata nel 2013.

In questo articolo, per la rendicontazione dello sviluppo e della convalida dei modelli ML, adottiamo le linee guida MINIMAR (Minimum Information For Medical AI Reporting) di recente pubblicazione (19).

Tutti i modelli di apprendimento sono stati implementati in Python (21) (utilizzando scikit-learn, ver. 0.23.1) tramite un flusso di lavoro che comprendeva:

- imputazione dei dati mancanti, utilizzando il metodo di imputazione multivariata iterativa (22), che permette di sostituire alle osservazioni incomplete dei valori stimati dalla distribuzione degli altri parametri. Il modello di imputazione dei dati mancanti è stato parametrizzato sulla base della distribuzione dei dati di addestramento, e successivamente integrato (con i medesimi parametri) nei modelli di apprendimento: questo consente l'applicazione dei modelli di ML anche in presenza di dati mancanti (come nel caso del parametro "Sospetto" nei dati di validazione esterna);
- normalizzazione dei parametri, al fine di garantire che i parametri avessero media nulla e varianza unitaria e fossero quindi espressi nella stessa scala;
- selezione dei parametri, al fine di eliminare parametri fortemente correlati e identificare i parametri più predittivi (utilizzando il metodo di eliminazione ricorsiva (23));

Tabella 1*Elenco dei 21 parametri utilizzati per l'addestramento dei modelli di Machine Learning*

| Parametro | Acronimo | Unità di misura | Percentuale di dati mancanti |
|--|----------|----------------------|------------------------------|
| Conteggio dei leucociti | WBC | 10 ⁹ /L | 4% |
| Conteggio delle emazie | RBC | 10 ¹² /L | 4% |
| Emoglobina | HGB | g/dL | 4% |
| Ematocrito | HCT | % | 4% |
| Volume corpuscolare eritrocitario medio | MCV | fL | 4% |
| Contenuto medio di emoglobina | MCH | pg/Cell | 4% |
| Contenuto medio percentuale di emoglobina delle emazie | MCHC | g Hb/dL | 4% |
| Plastrine | PLT | 10 ⁹ /L | 4% |
| Neutrofili, conteggio/percentuale | NET/NE | 10 ⁹ /L/% | 21% |
| Linfociti, conteggio/percentuale | LYT/LY | 10 ⁹ /L/% | 21% |
| Monociti, conteggio/percentuale | MOT/MO | 10 ⁹ /L/% | 21% |
| Eosinofili, conteggio/percentuale | EOT/EO | 10 ⁹ /L/% | 21% |
| Basofili, conteggio/percentuale | BAT/BA | 10 ⁹ /L/% | 21% |
| Sintomi COVID-19 specifici, al momento del triage | Sospetto | Yes/No | 0% |
| Età | | Anni | 3% |
| Sesso | | Maschio/Femmina | 0% |

- ottimizzazione degli iperparametri, per determinare la configurazione ottimale dei modelli di apprendimento eseguita tramite un metodo di ricerca a forza bruta (24).

Come da raccomandazioni (4), i dati sono resi disponibili gratuitamente tramite la piattaforma Zenodo (25).

I modelli sono stati validati da due dataset esterni (Ospedale di Desio, e Ospedale Papa Giovanni XXIII di Bergamo), comprendenti emocromi da pazienti COVID-19 positivi raccolti retrospettivamente presso i rispettivi dipartimenti di Pronto Soccorso (PS) nei mesi Marzo/Aprile 2020 (163 e 104 pazienti rispettivamente per Desio e Bergamo) e da emocromi di pazienti sicuramente negativi, del 2019, raccolti sempre da pazienti del PS (174 e 145 rispettivamente per Desio e per Bergamo). Le analisi sono state effettuate su analizzatori Sysmex XN-9000. L'età media dei dataset di Desio e Bergamo era, rispettivamente, 66,3 (2,0) e 54,4 (3,1) anni.

Le distribuzioni del sesso per i due dataset di convalida erano comparabili: 65% maschi e 35% femmine, per il dataset Desio; 68% maschi e 32% femmine, per il dataset di Bergamo. Entrambi i dataset non avevano valori mancanti per tutti i parametri considerati (elencati in Tabella 1) tranne che per la

funzione "sospetto COVID" stimata in base alla presenza o meno di sintomatologia COVID specifica per il quale, i dati mancanti rispettivamente per Desio e Bergamo, erano del 52% e del 53%.

Nella Figura 1, sono riportati in ordine di significatività i 15 parametri più significativi utilizzati nell'addestramento di due modelli: il RF e il kNN. Le Figure 2 e 3 mostrano le distribuzioni dei parametri chiave per il training e per la validazione rispettivamente per sospetto ed età (Figura 2) e per i parametri più significativi dell'emocromo (Figura 3). Come osservabile in Figura 2, a differenza che nei dati di addestramento, nei dati di validazione esterna nessun paziente COVID-19 negativo presentava sintomatologia sospetta, mentre tutti i pazienti COVID-19 positivi presentavano tale sintomatologia.

La convalida esterna è stata eseguita in termini di metriche basate sugli errori (accuratezza, sensibilità, specificità e area sotto la curva, AUC) (26).

RISULTATI

I risultati medi, insieme ai risultati dei diversi modelli, sono riportati nella Tabella 2. L' AUC e l'accuratezza dei modelli raggiunti sui due dataset di valutazione esterna sono mediamente del 95% e dell'87%. Per il dataset di

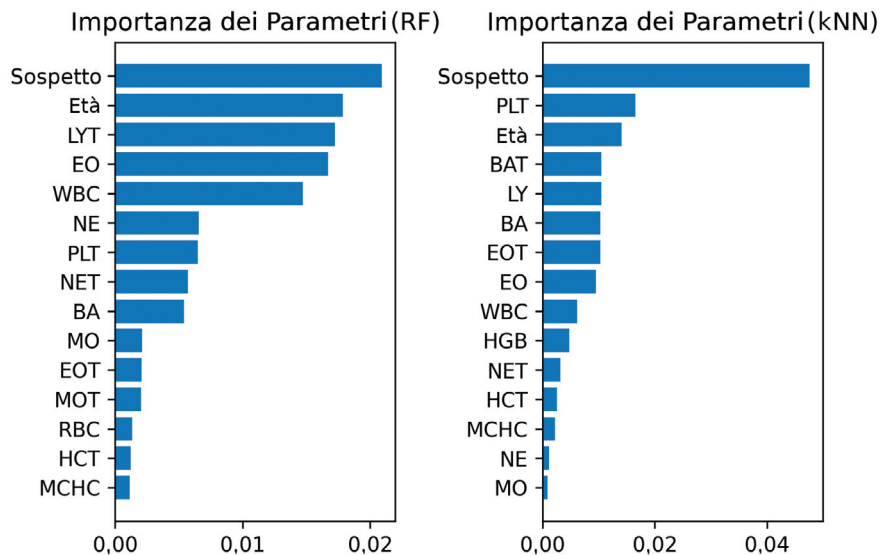


Figura 1

Punteggio di importanza dei 15 parametri più significativi (feature) utilizzati dall' algoritmo Random Forest (a sinistra) e dall' algoritmo k-Nearest Neighbors (a destra) addestrati sul dataset originale dei pazienti provenienti dall' Ospedale San Raffaele e dall' Istituto Ortopedico Galeazzi.

BAT, conteggio dei basofili; BA, basofili in percentuale; EOT, conteggio degli eosinofili; EO, eosinofili in percentuale; HCT, ematocrito; HGB, emoglobina; LYT, conteggio dei linfociti; LY, linfociti in percentuale; MCHC, contenuto medio percentuale di emoglobina delle emazie; MOT, conteggio dei monociti; MO, monociti in percentuale; NET, conteggio dei neutrofilii; NE, neutrofilii in percentuale; PLT, conteggio delle piastrine; RBC, conteggio delle emazie; WBC, conteggio dei leucociti. kNN, algoritmo k-Nearest Neighbors; RF, algoritmo Random Forest.

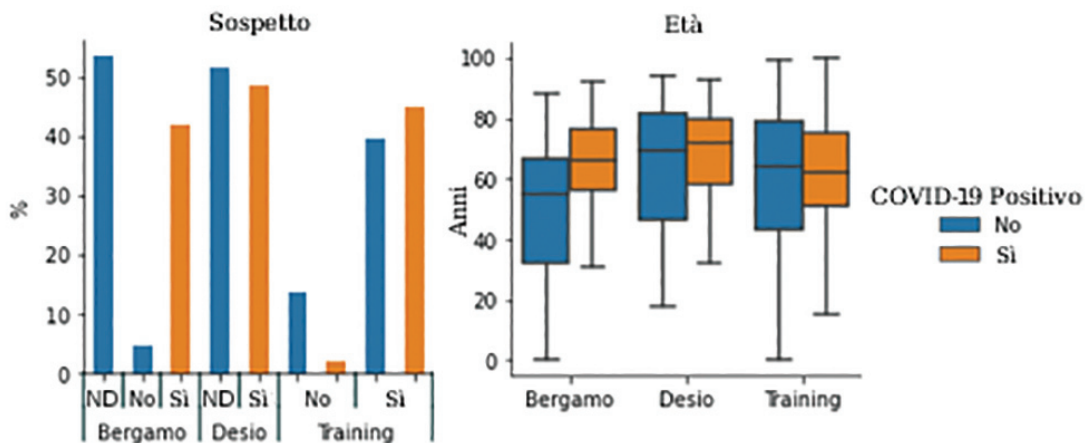


Figura 2

Bilanciamento dei parametri sospetto COVID ed età nel dataset di addestramento (training), e nei due dataset di validazione esterna di Bergamo e Desio. Le aree indicate in blu e in arancione, corrispondono rispettivamente ai casi COVID negativi e COVID positivi. ND, non disponibile.

Bergamo i migliori risultati in termini di AUC % si sono ottenuti dal modello SVM (AUC = 98%) per il dataset di Desio si è raggiunta una AUC del 97% per tre modelli: RF, LR e SVM.

Mediamente, la sensibilità ottenuta con il set di dati di Desio (92%) è risultata superiore a quella ottenuta dai

dati di Bergamo (78%), mentre la specificità di Desio (82%) è risultata inferiore a Bergamo (94%).

Nelle figure 4 e 5 vengono mostrate le curve ROC dei modelli valutati e le rispettive AUC per i due insiemi di dati, rispettivamente di Desio e di Bergamo.

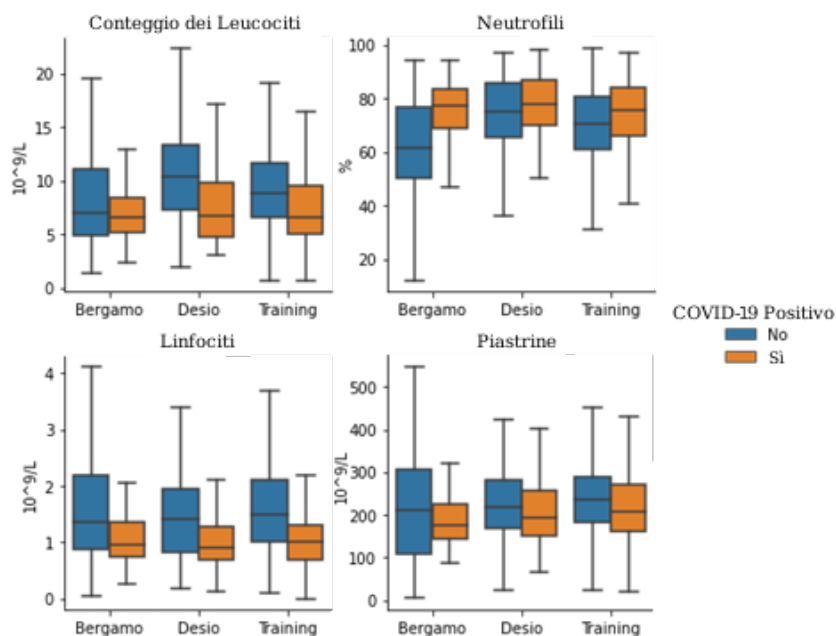


Figura 3
 Bilanciamento dei parametri più significativi dell'emocromo (conteggio dei leucociti e dei linfociti, neutrofili espressi in %, e piastrine) nel dataset di addestramento (training), e nei due dataset di validazione esterna di Bergamo e Desio. Le aree indicate in blu e in arancione, corrispondono rispettivamente ai casi COVID negativi e COVID positivi.

Tabella 2
 I risultati dei modelli valutati dai due dataset usati dalla validazione esterna (Desio e Bergamo). I modelli sono stati valutati in termini di accuratezza, sensibilità, specificità, e area sotto la curva (AUC, curva ROC). I valori sono riportati in formato percentuale (intervallo di confidenza al 95%). Per ogni dataset, i migliori valori di AUC sono evidenziati in neretto

| Modello ML | Accuratezza (Desio) | Sensibilità (Desio) | Specificità (Desio) | AUC (Desio) | Accuratezza (Bergamo) | Sensibilità (Bergamo) | Specificità (Bergamo) | AUC (Bergamo) |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|
| Random Forest | 91% (89-93) | 93% (91-95) | 89% (85-93) | 97% (95-99) | 86% (82-90) | 70% (64-76) | 98% (96-100) | 92% (89-95) |
| Logistic Regression | 91% (89-93) | 92% (90-94) | 91% (89-93) | 97% (95-99) | 92% (89-95) | 89% (85-93) | 94% (92-96) | 96% (94-98) |
| k-Nearest Neighbors | 87% (83-91) | 92% (90-94) | 83% (79-87) | 95% (93-97) | 85% (81-89) | 74% (68-80) | 93% (91-95) | 91% (87-95) |
| Support Vector Machine | 90% (86-94) | 91% (89-93) | 89% (85-93) | 97% (95-99) | 93% (91-95) | 84% (80-88) | 99% (97-100) | 98% (96-100) |
| Naive Bayes | 81% (77-85) | 93% (91-95) | 70% (64-76) | 94% (92-96) | 84% (80-88) | 76% (70-82) | 89% (85-93) | 93% (90-96) |
| Ensemble | 82% (78-86) | 92% (90-94) | 73% (69-77) | 95% (93-97) | 84% (80-88) | 73% (67-79) | 92% (89-95) | 94% (92-96) |
| Media | 87% (79-95) | 92% (91-93) | 82% (66-98) | 96% (94-98) | 87% (80-94) | 78% (64-92) | 94% (88-100) | 94% (90-98) |

DISCUSSIONE

Questo studio mostra i risultati della validazione esterna di 6 diversi modelli di ML, che sono stati addestrati utilizzando i soli dati dell'emocromo, per la diagnosi COVID-19, provenienti da una popolazione di più di 1700 pazienti (47% COVID positivi). La validazione esterna è stata effettuata utilizzando due dataset di altri due ospedali della regione Lombardia ben bilanciati tra di loro e rispetto al dataset iniziale di training (OSR e IOG) con cui si sono addestrati i diversi modelli di ML (Figure 2 e 3). Per il dataset di Desio tutti i risultati AUC ottenuti dai diversi modelli sono superiori al 95% (Figura 4) e infatti le curve ROC sono praticamente indistinguibili. Per il dataset di Bergamo (Figura 5), spiccano tra gli altri i valori di AUC del modello SMV (98%) e LR (96%), pur essendo tutti valori comunque superiori al 90%.

I modelli che abbiamo convalidato si confrontano favorevolmente con lo stato dell'arte esistente: più specificamente, ottengono migliori risultati del modello

descritto da Yang et al. (14) che ha riportato un valore di AUC dell'84% ed è stato, fino ad ora, l'unico modello ML definito come avente affidabilità clinica (4). Allo stesso modo, i risultati riportati dal nostro studio sono competitivi anche rispetto agli altri lavori in letteratura per i quali è stata effettuata una validazione esterna: Soltan et al. hanno ottenuto un'AUC dell'87% (12); Plante et al. riportano una AUC del 91%, con alta sensibilità (tra 92,6% e 95,9%) ma una specificità molto bassa (tra 41,7%) (11); Wu et al. riportano un'accuratezza del 96% (sensibilità: 95%, specificità: 97%) (13), sebbene il modello sia stato descritto come affetto da bias, sia in termini di dimensione della popolazione (il modello è stato addestrato e convalidato esternamente su set di dati che comprendono solo 146 e 74 pazienti, rispettivamente) e definizione dello scopo (il modello è stato addestrato per distinguere i pazienti COVID-19 da pazienti affetti da altre malattie polmonari, come il cancro del polmone o la tubercolosi) (13). A differenza degli approcci descritti negli studi precedentemente citati (11-14), i modelli che abbiamo sviluppato per la diagnosi

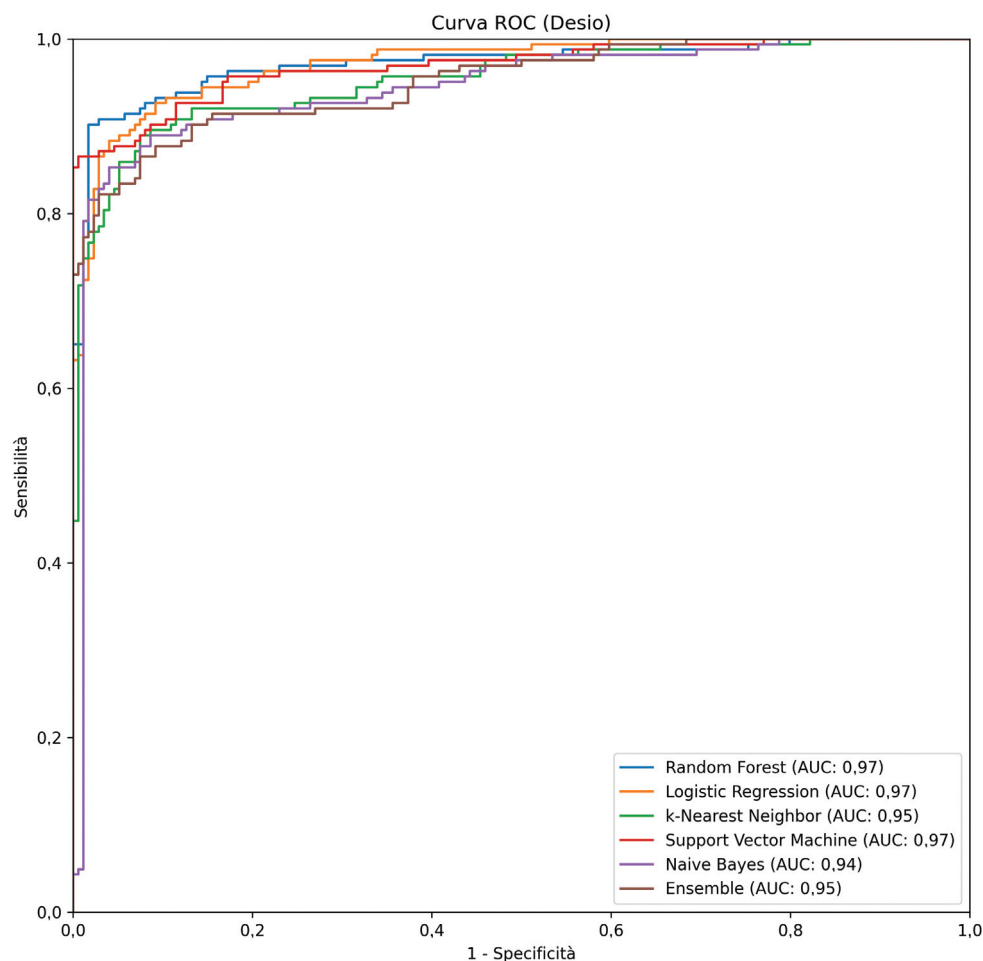


Figura 4

Risultati della validazione esterna per il dataset di Desio in termini di AUC: curva ROC per i 6 modelli considerati: Random Forest, Logistic Regression, Support Vector Machine, k-Nearest Neighbors, Naive Bayes e il modello di combinazione (Ensemble).

COVID-19 si basano solo su parametri demografici (sesso ed età), sulla sintomatologia COVID specifica in termini SI/NO, e sui soli dati dell'emocromo che è un esame diagnostico veloce ed economico. I due set di dati che sono stati utilizzati per la validazione esterna, sono stati raccolti retrospettivamente, ragione per la quale nel 50% dei casi l'informazione dicotomica relativa alla sintomatologia COVID specifica considerata nel nostro modello è mancante. In modo particolare, per i pazienti COVID positivi, per i quali le informazioni sono state rese disponibili nei giorni a seguire dal primo accesso in PS (pazienti che erano ricoverati in reparti di malattie infettive e/o in rianimazione, saturazioni di O₂ evidentemente patologiche), abbiamo desunto che si fossero presentati in PS per sintomatologia COVID. Per i pazienti COVID negativi, non ricoverati in ospedale per i quali non erano disponibili ulteriori informazioni, il parametro sintomatologia non è stato compilato.

Tuttavia, tale informazione è di facile reperibilità. Infatti, trattandosi di pazienti afferenti al PS, qualora il paziente si presenti per una ragione totalmente diversa

dal sospetto COVID (ad esempio incidente, fratture, aborto spontaneo) il campo sintomatologia COVID specifica viene indicato uguale a NO. Al contrario, per sintomi riconducibili al sospetto COVID, come ad esempio dispnea, polmonite, febbre, mal di gola, influenza, tosse, faringite, bronchite, malessere generalizzabile), il campo sintomatologia COVID specifica è stato indicato uguale a SI (15).

Da sottolineare per altro che i modelli in ML integrano una fase di imputazione dei dati mancanti; se alcuni dati mancano allora il modello cerca di "inferire" i valori mancanti sulla base di quelli presenti (e sulla base della distribuzione nei dati di addestramento): quindi più parametri sono presenti e più il modello è in grado (sfruttando le correlazioni nei dati) di ipotizzare dei valori plausibili per i campi mancanti. Perché il modello possa essere applicato infatti non c'è un vero e proprio numero di parametri minimi necessari ma i risultati diventano sempre meno sensati/informativi tanti più parametri mancano (27). Il fatto quindi che nei dati di validazione esterna mancasse nel 50% dei pazienti l'informazione

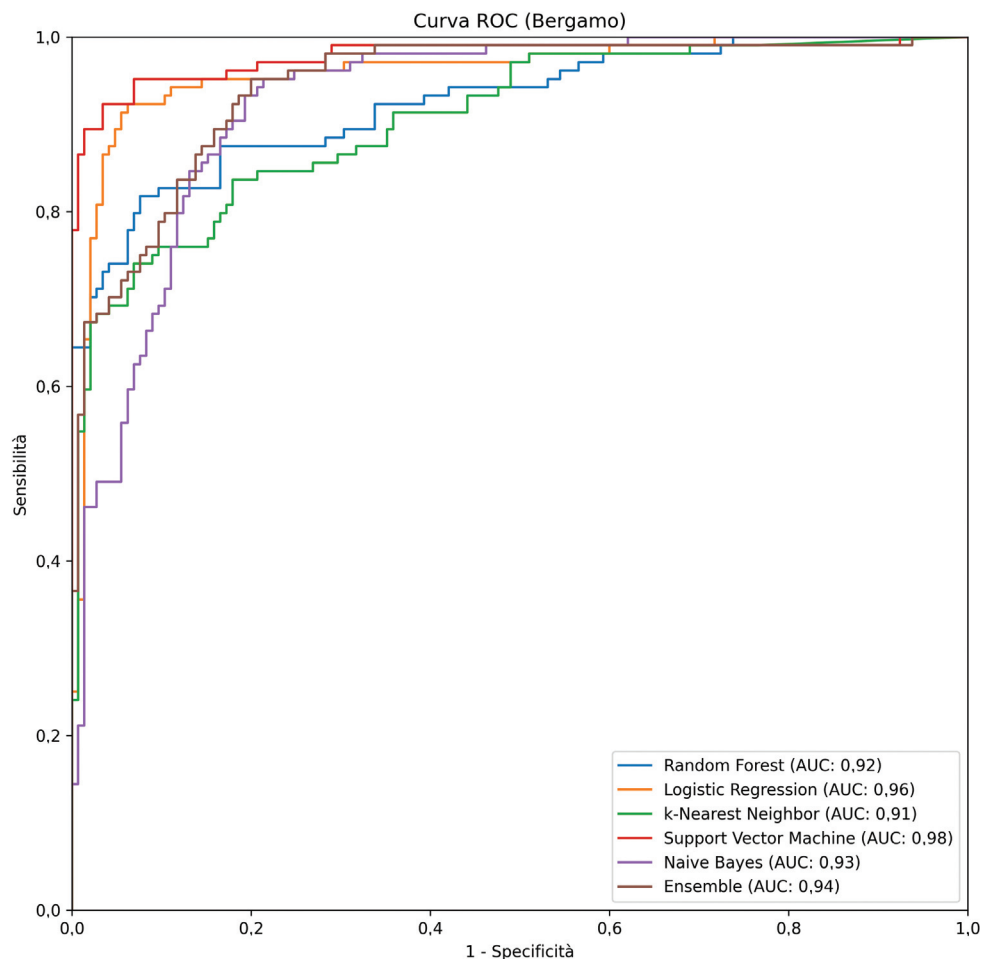


Figura 5

Risultati della validazione esterna per il dataset di Bergamo in termini di AUC: curva ROC per i 6 modelli considerati: Random Forest, Logistic Regression, Support Vector Machine, k-Nearest Neighbors, Naive Bayes e il modello di combinazione (Ensemble).

della sintomatologia COVID specifica, non ha impedito che il modello raggiungesse risultati di AUC >90%.

Il risultato ottenuto dai set di validazione esterna qui riportato (AUC >90%) significa che un modello di ML, così convalidato, che utilizza i soli dati dell'emocromo, potrebbe essere adottato come metodo di supporto al test RT-PCR, per l'identificazione rapida ed economica di pazienti positivi a COVID-19. D'altra parte, considerando le componenti relativamente contenute di variabilità dei dati dell'emocromo, sia analitica (28), che garantisce una riproducibilità dello stesso dato fra laboratori di altri ospedali, sia biologica (29-31), che supporta la riproducibilità dei risultati ottenuti per lo stesso paziente in tempi diversi, sono elementi che supportano la riproducibilità dei dati che è l'obiettivo più importante di qualsiasi attività di validazione esterna (32-33).

Per questo motivo, questo strumento potrebbe essere facilmente adottato nei paesi in via di sviluppo (34), così come in qualsiasi paese che deve affrontare un rapido aumento di contagi, poiché l'emocromo è un'indagine diagnostica ampiamente adottata. Da tener presente che l'utilizzo del modello qui presentato, prima di essere implementato, dovrà comunque tener conto delle eventuali differenze etniche della popolazione che possono essere caratterizzate da valori di riferimento diversi dei parametri ematologici (35-37), per i quali sarà necessaria una apposita validazione utilizzando un set di dati della popolazione locale.

Un modello in ML così concepito potrà essere utilizzato anche una volta che la pandemia COVID-19 si sarà ridimensionata in una malattia più endemica e controllata, in quanto potrebbe permettere il rapido triage dei pazienti ammessi sulla base dei risultati dell'emocromo, facilitando così gli operatori sanitari in termini di gestione profilattica e di una veloce allocazione del paziente nel reparto. La sensibilità, che in epidemiologia si definisce come la capacità di un test di screening di individuare in una popolazione di riferimento i soggetti malati, ottenuta dal modello SVM con le migliori prestazioni, è risultata del 84% con i dati di Bergamo arrivando addirittura a valori superiori al 90% con i dati di Desio.

Un limite della presente validazione è sicuramente rappresentato dal lasso temporale con cui sono stati raccolti i dati. Infatti, sia in fase di addestramento del modello con i dati raccolti all'OSR e all'IOG, sia in fase di validazione esterna con i dati di Desio e di Bergamo, sono stati considerati i dati dei soli pazienti dell'inizio della pandemia (Marzo 2020-Aprile 2020) e non è possibile escludere che le alterazioni dei dati dell'emocromo con i pazienti attuali non siano riconoscibili con altrettanta efficacia. Da questo punto di vista, una volta affrontati e risolti i problemi relativi alla gestione della privacy come sottolineato di recente da Guerranti et al. (38), e dall'editoriale di Vidali (39), sarebbe auspicabile, se pur in via sperimentale, l'implementazione del modello nel middleware del laboratorio per una validazione ulteriore del modello con pazienti afferenti in PS in tempi diversi.

Un altro limite di questo lavoro è, rappresentato dal

fatto che il modello è stato addestrato, e convalidato esternamente, da risultati ottenuti da analizzatori ematologici Sysmex, che pur rappresentando oltre il 50% del mercato globale in ematologia (40), non è l'unica tecnologia in commercio. Gli utenti di Sysmex potrebbero quindi utilizzare i modelli qui illustrati per migliorare la loro gestione logistica una volta integrati nel loro flusso di lavoro di refertazione. D'altra parte, gli utenti di altri analizzatori ematologici dovrebbero tenere conto dei diversi metodi utilizzati per i parametri dell'emocromo (ad esempio impedenza elettrica o tecnologie ottiche) (28,31).

Infine, un modello validato sui dati dell'emocromo, può essere utile per i suoi punteggi probabilistici, poiché questi possono essere utilizzati in contesti di test multipli: ad esempio per stimare i valori predittivi negativi, in modo da aiutare i medici di medicina generale a escludere la positività del COVID-19 per soggetti in quarantena; o per stimare meglio a priori la probabilità di malattia COVID-19 e aumentarne l'affidabilità in termini di valore predittivo positivo.

Il modello assemblato "*Machine Learning-based COVID-19 detection tool from complete blood count*" che abbiamo convalidato in questo lavoro è reso disponibile gratuitamente online al seguente link: <https://covid19-bloodtests-ml.herokuapp.com/> (41).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (Ultimo accesso: Marzo 2021).
2. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;8:CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.
3. Ferrari D, Motta A, Strollo M, et al. Routine blood tests as a potential diagnostic tool for COVID-19. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1095-9.
4. McCudden CR. Deus Ex Machina? Predicting SARS-CoV-2 Infection from Lab Tests Using Machine Learning. *Clin Chem* 2020;66:1365-6.
5. Rasheed J, Jamil A, Hameed AA, et al. A survey on artificial intelligence approaches in supporting frontline workers and decision makers for covid-19 pandemic. *Chaos Solitons Fractals* 2020;141:110337.
6. Wynants L, Van Calster B, Collins GS et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of COVID-19: systematic review and critical appraisal. *BMJ* 2020;369:m1328. doi: 10.1136/bmj.m1328.
7. Cozzi A, Schiaffino S, Arpaia F, et al. Chest x-ray in the covid-19 pandemic: Radiologists' real-world reader performance. *Eur J Radiol* 2020;132:109272.
8. Kovács A, Palásti P, Veréb D, et al. The sensitivity and specificity of chest CT in the diagnosis of covid-19. *Eur Radiol* 2020:1-6.
9. Harahwa TA, Yau THL, Lim-Cooke MS, et al. The optimal diagnostic methods for covid-19. *Diagnosis* 2020;7:349-56.
10. Nevin L. Advancing the beneficial use of machine learning

- in health care and medicine: toward a community understanding. *PLoS Med* 2018;15:e1002708.
11. Plante TB, Blau AM, Berg AN, et al. Development and external validation of a machine learning tool to rule out covid-19 among adults in the emergency department using routine blood tests: A large, multicenter, real-world study. *J Med Internet Res* 2020;22:e24048.
 12. Soltan AA, Kouchaki S, Zhu T, et al. Rapid triage for covid-19 using routine clinical data for patients attending hospital: development and prospective validation of an artificial intelligence screening test. *The Lancet Digit Health* 2021;3:e78-e87.
 13. Wu J, Zhang P, Zhang L, et al. Rapid and accurate identification of covid-19 infection through machine learning based on clinical available blood test results. *Med Rxiv* 2020.
 14. Yang HS, Hou Y, Vasovic LV, et al. Routine laboratory blood tests predict SARS-CoV-2 infection using machine learning. *Clin Chem* 2020;66:1396-404.
 15. Cabitza F, Campagner A, Ferrari D, et al. Development, evaluation, and validation of machine learning models for COVID-19 detection based on routine blood tests. *Clin Chem Lab Med* 2020;59:421-31.
 16. Brinati D, Campagner A, Ferrari D, et al. Detection of COVID-19 infection from routine blood exams with machine learning: A feasibility study. *J Med Syst* 2020;44:135.
 17. Kukar M, Gunc'ar G, Vovko T, et al. Covid-19 diagnosis by routine blood tests using machine learning. *arXiv preprint* 2020. [arXiv:2006.03476](https://arxiv.org/abs/2006.03476).
 18. Cabitza F, Zeitoun JD. The proof of the pudding: in praise of a culture of real-world validation for medical artificial intelligence. *Ann Transl Med* 2019;7:161.
 19. Hernandez-Boussard T, Bozkurt S, Ioannidis J P, et al. Minimar (minimum information for medical AI reporting): Developing reporting standards for artificial intelligence in health care. *JAmMed Inform Assoc* 2020;27:2011-5.
 20. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* 2020;323: 574-81.
 21. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, et al. Scikit-learn: Machine learning in Python. *JMacLearn Res* 2011;12: 2825-30.
 22. Buuren SV, Groothuis-Oudshoorn K. Mice: Multivariate imputation by chained equations in r. *J Stat Softw* 2010;45:1-68.
 23. Guyon I, Weston J, Barnhill S, et al. Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Mach Learn* 2002;46:389-422.
 24. Varma S, Simon R. Bias in error estimation when using crossvalidation for model selection. *BMC bioinformatics* 2006;7:91.
 25. <https://zenodo.org/record/4081318#.YAFe5xYo-Uk> [Ultimo accesso: Marzo 2021]
 26. Cabitza F, Campagner A, Del Zotti F, et al. All you need is higher accuracy? On the quest for minimum acceptable accuracy for medical artificial intelligence. In *e-Health 2020, Proceedings of the 12th International Conference on e-health E-health 2020*:159-66. IADIS.
 27. Cabitza F, Banfi G. Machine learning in laboratory medicine: waiting for the flood? *Clin Chem Lab Med* 2018;56:516-24.
 28. Vidali M, Carobene A, Apassiti Esposito S, et al. Standardization and harmonization in hematology: Instrument alignment, quality control materials, and commutability issue. *Int J Lab Hematol* 2020. doi: 10.1111/ijlh.13379.
 29. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short-and medium-term biological variation estimates of red blood cell and reticulocyte parameters in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:954-63.
 30. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. *Clin Chim Acta* 2017;473:147-56.
 31. Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, et al. Biological variation of platelet parameters determined by the Sysmex XN hematology analyzer. *Clin Chim Acta* 2017;470:125-32.
 32. Campagner A, Cabitza F, Ciucci D. Three-way decision for handling uncertainty in machine learning: a narrative review. *International Joint Conference on Rough Sets* 2020. *Lecture Notes in Computer Science*, vol 12179. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-52705-1_10.
 33. Campagner A, Cabitza F, Ciucci D. The three-way-in and threeway- out framework to treat and exploit ambiguity in data. *Int J Approx Reason* 2020;119:292-312.
 34. Onyeaghala AA, Olajide I. Managing COVID-19 outbreak in Nigeria: matters arising. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1645-50.
 35. Karayalcin G, Rosner F, Sawitsky A. Pseudo-neutropenia in American negroes *Lancet* 1972;1(7746):387.
 36. Lim EM, Cembrowski G, Cembrowski M, et al. Race-specific WBC and neutrophil count reference intervals. *Int J Lab Hematol* 2020;32:590-7.
 37. Carobene A, Kiarie AG, Tsegaye M, et al. A very uncommon haemoglobin value resulting from a severe acute malnutrition in a 16-month-old child in Ethiopia. *Clin Chem Lab Med*. 2020;59:e103-e105.
 38. 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.
 39. Vidali M. I Big Data e la Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2021;45:1:13-4.
 40. <https://www.sysmex.co.jp/en/ir/library/annual-reports/> (Ultimo accesso: Marzo 2021).
 41. <https://covid19-bloodtests-ml.herokuapp.com/> (Ultimo accesso: Marzo 2021).

Comunicare nell'infosfera: sfide e opportunità per la Medicina di Laboratorio

Valeria D'Argenio^{1,2}, Eugenio Iorio³, Rossella Tomaiuolo⁴, Claudia Bellini⁵, Marie Lenksi⁶, Emilia Giannella⁷, Margherita Berardi⁸, Santiago Fares Taie⁹, Giulia Sancesario^{7,10}

¹Dipartimento di Promozione delle Scienze Umane e della Qualità della Vita, Università Telematica San Raffaele, Roma

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Via G. Salvatore 486, Napoli

³Dipartimento di Scienze formative, psicologiche e della comunicazione, Università degli Studi Suor Orsola Benincasa, Napoli

⁴Università Vita - Salute San Raffaele, Milano

⁵UOC Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Misericordia Grosseto, Azienda USL Toscana Sud Est

⁶Università di Lille, CHU Lille, Istituto Pasteur di Lille, ULR 4483 - IMPECS - IMPact of Environmental Chemicals on human health, F-59000 Lille, France

⁷Biobanca, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

⁸IFCA - Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

⁹Dipartimento di Analisi Clinica, Fares Taie Biotecnologia, Mar del Plata, Argentina

¹⁰Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Roma

Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, nella Sessione Young Scientists

ABSTRACT

Communicating in the infosphere: challenges and opportunities for Laboratory Medicine

Communication is becoming more important than ever for health care and health care professionals, as the recent COVID-19 pandemic has dramatically highlighted. The fast evolution of the mass and social media and the continuous development of new health-related platforms and applications are imposing new challenges that involve also laboratory medicine and that need to be carefully considered. In fact, these novel, fast and effective strategies of communication are inherently prone to the risk of publishing misleading, incorrect or fake information which can spread uncontrollably and diffuse all over the world in a very short time. However, social media are undoubtedly a great opportunity to communicate, in a responsible and credible way, health-related data and scientific updates and discoveries. As for the therapeutic alliance, it is now required to establish an "information alliance" between different healthcare professionals which, based on a trustworthy relationship, will allow the correct diffusion of health-related information and will contribute to citizens' education.

Parole chiave: infodemia, disinformazione, misinformazione

INTRODUZIONE

La malattia COVID-19 da coronavirus SARS-CoV-2, la più grave emergenza sanitaria mondiale documentata degli ultimi decenni, ha richiamato l'attenzione sulla rilevanza della comunicazione e sull'impatto dell'uso dei media in ambito sanitario. Infatti, la disponibilità di piattaforme digitali di comunicazione, non dotate di rigido controllo sui contenuti scientifici pubblicati, associata alla carenza di conoscenze scientifiche pregresse sull'evoluzione patologica dell'infezione da SARS-CoV-2, hanno determinato "misinformazione" e

"disinformazione", entrambe insidiose basi per la diffusione delle cosiddette "notizie false" (vedi Glossario). Le più comuni piattaforme social digitali, come Facebook, Instagram, Twitter e LinkedIn, contano milioni di utenti in tutto il mondo, e permettono una rapida condivisione di foto, testi, documenti e link.

"L'infosfera" è sempre più caratterizzata dal "sovraccarico informativo" che pervade la nostra quotidianità (vedi Glossario); la saturazione del tempo di attenzione e la frammentazione dei media non favoriscono l'elaborazione critica delle notizie da parte degli utenti, al tempo stesso vittime e complici di

Corrispondenza a: Giulia Sancesario, Via Ardeatina 354, 00179 Roma, E-mail giulia.sancesario@gmail.com

Ricevuto: 19.01.2021

Revisionato: 27.02.2021

Accettato: 02.03.2021

Publicato on-line: 08.04.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.017

misinformazione e disinformazione (1).

Tuttavia, è innegabile che i media rappresentino un valido strumento di formazione e informazione in ambito sanitario, ad esempio favorendo sia la collaborazione scientifica tra pari a livello nazionale e globale sia la condivisione di informazioni con la popolazione. Le reti medico-paziente o paziente-paziente e i siti specializzati, gestiti da professionisti in grado di verificare e sottoporre a controllo costante le fonti di informazione, sono uno strumento indispensabile per la promozione della salute e della cultura della prevenzione.

Sulla base di queste riflessioni, il Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists (GdS YS) ha promosso una sessione scientifica dal titolo "Media e Medicina di Laboratorio: un'alleanza possibile?" all'interno del Congresso Nazionale SIBioC 2020, che si è svolto per la prima volta in modalità virtuale, proprio a causa dell'emergenza sanitaria.

Questo lavoro, originato dalle riflessioni sviluppate in sede congressuale, è focalizzato sull'importanza di gestire la comunicazione scientifico-sanitaria che avviene attraverso i "social media" (vedi Glossario): l'esempio discusso è quello della COVID-19, che ha drammaticamente investito tutti i mezzi di comunicazione, con un impatto dirompente in ambito sanitario e un coinvolgimento diretto della Medicina di Laboratorio (MdL).

INFOSFERA: L'INFLUENZA DELLA DISINFORMAZIONE

L'infosfera, ovvero la totalità dello spazio informativo (1), è sempre più caratterizzata dalla saturazione del tempo di attenzione e dalla frammentazione dei media, che agiscono in maniera pervasiva, determinando il fenomeno del sovraccarico informativo. Queste trasformazioni contribuiscono al passaggio dall'economia dell'attenzione a quella delle emozioni polarizzate. In questo nuovo sistema, infatti, emerge la difficoltà di interpretazione critica nel distinguere il reale dal falso, cui si contrappone un'accelerazione senza precedenti del tempo mentale; determina inoltre lo sviluppo dei tratti dell'iperattività, della transitorietà e dell'incertezza, che sono tipici dell'era postmoderna e della complessità della nostra società (2,3).

Nel 2016, l'Oxford English Dictionary aggiungeva al proprio dizionario la parola "post-verità", un neologismo che fa riferimento ad una società dove i fatti oggettivi sono meno influenti nella formazione dell'opinione pubblica rispetto ad informazioni che muovono le emozioni o che rinforzano le credenze personali. Infatti, la perdita di autorevolezza, credibilità e attendibilità delle fonti tradizionali, associata alla crescente autonomia dell'utente nella composizione dei palinsesti e al nuovo ruolo degli individui digitali, che sono contemporaneamente utenti, produttori e distributori di contenuti, porta alla perdita della mediazione, un fenomeno chiave per la comprensione dell'infosfera.

Nell'infosfera globale le trasformazioni cognitive,

percettive e mnemoniche imposte dalle tecnologie hanno disattivato il ragionamento critico, ridotto la sensibilità e distrutto i fondamenti del comportamento etico. Infatti, questo "disturbo dell'informazione" (vedi Glossario) sfrutta opinioni polarizzate, condivisione delle emozioni, effetti cognitivi derivanti dal sovraccarico informativo, bias cognitivi ed "echo chambers" (vedi Glossario), notizie false e disinformazione determinando così una profonda modifica nell'esposizione della mente cosciente all'informazione che è talmente rapida e breve da impedire l'elaborazione critica.

L'infrastruttura primaria dell'informazione nell'infosfera è l'arena infomercial (intreccio delle parole inglesi information e commercial) in cui miti, luoghi comuni, notizie false, teorie della cospirazione, propagande e strutture narrative ricorrenti determinano le modalità di comportamento (mitopoiesi).

L'epidemia da COVID-19 ha rapidamente scatenato un'infodemia (vedi Glossario) non solo attraverso le piattaforme online, come Facebook, YouTube, o i servizi di messaggistica, ma anche attraverso media tradizionali, inondandoli 24 ore su 24 con una valanga di annunci fuorvianti, notizie false, narrazioni su teorie della cospirazione e molto altro ancora.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nelle linee guida relative al "Communicating risk in public health emergencies", pubblicate nel 2017, dichiara che: *"La comunicazione del rischio è un elemento di vitale importanza per la salute pubblica. Durante le emergenze di salute pubblica, le persone devono sapere quali rischi per la salute affrontano, la natura e l'entità dell'evento e quali azioni possono intraprendere per proteggere la propria salute e la propria vita"* (4).

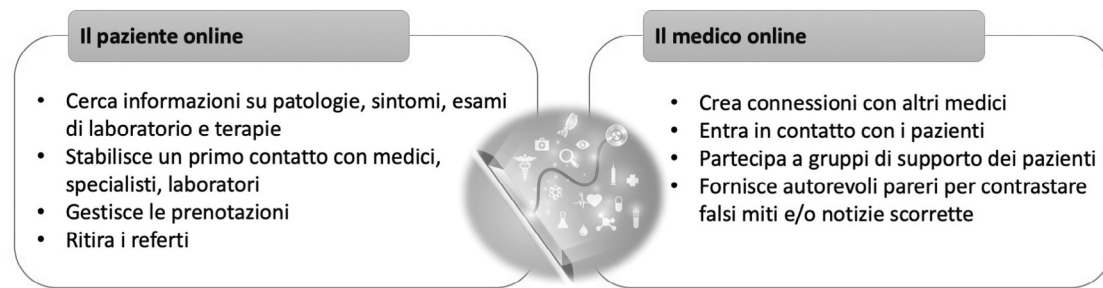
Il problema dell'inquinamento delle notizie false e della guerra alla (dis)informazione – che, ormai, ha raggiunto e inondato l'ambito della divulgazione scientifica, e che prolifera nei media alternativi, ma permane nei media professionali – incide, sempre con maggior peso, sulla sfera cognitiva, percettiva e mnemonica dell'umanità (3,5).

L'utilizzo del metodo scientifico costituisce un valido rimedio nei confronti di percezioni ingannevoli e volutamente orientate, dato che i pregiudizi e le percezioni sbagliate sono più frequenti se basate su fonti ambigue e spesso discordanti.

La nostra società ha bisogno di persone che si interrogano sulla contemporaneità senza filtri e senza limiti, e che operino attraverso principi e metodo scientifico per la produzione di conoscenza e per la comprensione di una realtà dove "nulla è come sembra".

I SOCIAL MEDIA E L'INFORMAZIONE SANITARIA

I social media si sono rapidamente e definitivamente imposti come mezzo di comunicazione in grado di connettere e coinvolgere un elevato numero di persone in un tempo molto breve, grazie alla semplicità di utilizzo e, soprattutto, ai costi bassi. Attraverso i social media è

**Figura 1**

L'utilizzo dei social media è ritenuto semplice, rapido, in grado di ottimizzare tempi, massimizzare le risorse e creare nuove modalità di connessione.

possibile condividere l'indirizzo di un sito, un link, un pensiero, immagini, video e documenti che, una volta in rete, possono essere ulteriormente condivisi, anche tra sconosciuti. La conseguenza di tale fenomeno è la creazione di un ambiente ricco di informazioni, non sempre supportate dalla fonte dei dati e/o dalla data di pubblicazione e, spesso, estrapolate dal contesto iniziale. Il rischio di tale sistema è che anche conclusioni errate, notizie prive di fondamento, o non meritevoli di risonanza possano essere incautamente diffuse e condivise da altri utenti, venendo interpretate come verità (6). Inoltre, l'immaterialità che caratterizza questo tipo di comunicazione, agevola il senso di deresponsabilizzazione: ciascun utente ha il controllo della propria piattaforma e dei dati contenuti in essa ma, una volta avvenuta la condivisione, altri utenti potranno diffondere quei dati, attraverso un sistema di vasi comunicanti social e non, senza che il proprietario originale ne abbia il controllo.

In materia di sanità, evidenze scientifiche e opinioni possono essere ugualmente diffuse, se non si presta la dovuta attenzione alla verifica della fonte: professionisti medici, pazienti e cittadini comuni, infatti, si trovano su uno stesso piano comunicativo (7), e possono diffondere un'informazione scientifica accurata, ma anche disinformazione, generata intenzionalmente o meno (8).

La gestione della comunicazione in materia di salute attraverso i social media è un tema centrale in sanità, inclusa la ricerca delle informazioni e interpretazioni riguardo gli esami di laboratorio, considerando anche la spinta proattiva verso il proprio stato di salute (9). Ad esempio, i social media facilitano l'accesso all'informazione e all'educazione sanitaria, consentono di gestire attività quali la prenotazione delle visite mediche e il ritiro dei referti, soprattutto grazie all'impiego di applicazioni (app), e hanno recentemente introdotto le comunità sanitarie online, ossia reti di supporto costituite da pazienti e professionisti sanitari (10).

L'uso dei social media per la comunicazione sanitaria è aumentato negli ultimi anni ed è ritenuto vantaggioso dai pazienti e dai professionisti sanitari (Figura 1) (11). Se la natura interattiva e partecipativa dei social media costituisce un vantaggio, non bisogna dimenticare il

possibile impatto negativo generato dall'informazione errata o dalla disinformazione sui percorsi di diagnosi e cura (3,12). L'analisi "SWOT" (vedi Glossario) si rivela uno strumento utile per mettere in evidenza i punti di forza (Strengths), le debolezze (Weaknesses), le opportunità (Opportunities) e le minacce (Threats) rappresentate dall'uso dei social media in ambito sanitario e, in generale, per la salute, come l'approfondimento e la consultazione degli esami di laboratorio (Figura 2). Da questa analisi si deduce che la comunicazione attraverso i social media ha caratteristiche positive (come ad esempio la possibilità di intercettare e rispondere ai bisogni dei pazienti, o promuovere la prevenzione), che la rendono uno strumento da implementare, soprattutto per l'opportunità di gestire la disinformazione attraverso la definizione a priori di una strategia di gestione dei social media. Ad esempio, si sta diffondendo l'uso di brevi filmati, cartoni animati, fumetti e diapositive che spiegano come prevenire le malattie e riconoscerne alcuni segni e sintomi precocemente, oppure promuovono l'adozione di comportamenti e stili di vita corretti (13). La gestione di una corretta comunicazione minimizza i punti di debolezza, rappresentati sostanzialmente dalla rapida e incontrollata diffusione di notizie, che svalutano l'atto medico e la conoscenza scientifica, ma confermano convinzioni consolidate dal passaparola o dalla propria storia personale (confirmation bias) (14). L'analisi SWOT, inoltre, permette di evidenziare i punti su cui focalizzare l'attenzione per evitare che gli stessi rappresentino una minaccia. Ad esempio, è importante considerare che la tecnologia sanitaria deve necessariamente avvalersi di protocolli di sicurezza, in quanto i dispositivi non sono sempre crittografati dagli utenti che potrebbero operare su reti non protette. Inoltre, affinché la comunicazione sia fruibile da un elevato numero di persone, è necessario superare il divario digitale (digital divide) e implementare l'alfabetizzazione degli utenti nel linguaggio sulla salute: comunicare non è sufficiente, bisogna rendere le informazioni significative e sostenute da argomentazioni scientifiche solide, facendo, però, attenzione al linguaggio utilizzato (15).

Questo è un aspetto cruciale in relazione all'ampia

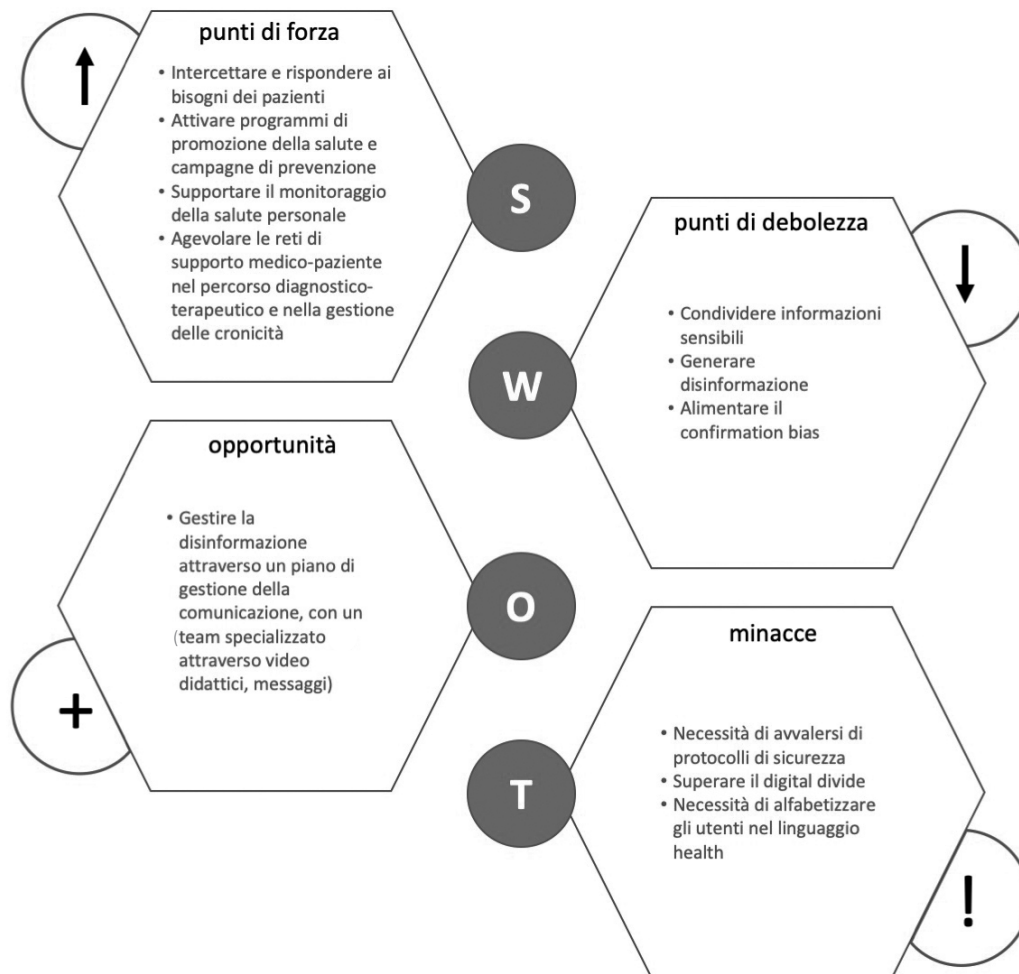


Figura 2
 Analisi SWOT dei punti di forza (S), di debolezza (W), opportunità (O) e minacce (T) dell'uso dei social media in ambito sanitario.

offerta di differenti tipologie di esami di laboratorio, sia per la vastità dell'argomento che per l'attitudine di molti utenti a cercare sui media un approfondimento riguardo le indagini diagnostiche o, in alcuni casi, l'interpretazione dei risultati ottenuti, sostituendosi al proprio medico. In questo caso, proprio la verifica della fonte e la disponibilità di siti certificati garantiscono l'affidabilità dell'informazione medica. Una testimonianza di quanto affermato è rappresentata da LabTestsOnline (LTO), promosso dall'American Association of Clinical Chemistry (AACC) e tradotto in Italiano, con il contributo di SIBioC (16) è reso disponibile sia ai professionisti che ai cittadini. LTO può essere definito come una vera e propria "enciclopedia della Medicina di Laboratorio", liberamente consultabile da coloro che sono alla ricerca di informazioni rigorose da un punto di vista scientifico, ma fornite con un linguaggio privo di tecnicismi e fruibile dalla maggior parte della popolazione (17). Infatti, la complessità degli esami di laboratorio e la sempre più frequente introduzione di nuovi esami, determinano la necessità di

migliorare e aggiornare continuamente le conoscenze degli utilizzatori primari, ovvero i medici che prescrivono gli esami di laboratorio, e finali, ovvero i pazienti. L'affidabilità del sito, oltre ad essere garantita dalla presenza di un comitato di revisori, è certificata dall'adesione allo standard di Health On the Net (HONcode), che garantisce l'affidabilità dell'informazione medica. La promozione del sito attraverso i social è una strategia che aumenta la fruibilità e l'accessibilità da parte di un numero maggiore di utenti. L'impatto avuto sugli accessi al sito dopo l'apertura ai social di LTO (17), con la creazione del profilo Twitter @LabTestsIT e la diffusione dei post di LTO sulla pagina Facebook della Società (@SIBioCmedicinadilaboratorio), sottolinea quanto queste nuove modalità di comunicazione siano fondamentali e utili e debbano essere quindi necessariamente previste in un piano coordinato di promozione della salute e dell'informazione. Inoltre, la sezione "Lascia i tuoi commenti", nata per ottenere pareri dagli utenti, viene sempre più spesso utilizzata

per inviare richieste di supporto per l'interpretazione di alcuni esami di laboratorio, spesso corredate da richieste di contatti dei laboratori e/o ospedali nei quali è possibile sottoporsi ad un determinato esame, soprattutto di tipo specialistico. Lo studio degli accessi a LTO evidenzia un altro aspetto interessante: da un sondaggio effettuato nel 2019, è emerso che in poco meno del 36% dei casi il sito viene consultato da professionisti del settore sanitario (nella metà dei casi si tratta di medici e infermieri) (17). Questo sottolinea l'importanza di una rete tra professionalità multidisciplinari, in cui la condivisione delle conoscenze agevoli la crescita reciproca nelle competenze, a vantaggio degli utenti finali.

MISINFORMAZIONE E FAKE NEWS: LE MINACCE PER LA SALUTE

La ricerca di informazioni inerenti la salute è uno dei principali motivi di accesso alla rete e lo è stata fin dalla diffusione popolare di internet negli anni novanta. Con l'avvento dei blog e dei forum, in cui gli utenti stessi hanno cominciato a introdurre informazioni online e, più recentemente, con l'esplosione delle piattaforme social, la velocità di circolazione di quantità incredibili di informazioni ha raggiunto livelli incontrollabili (18). Inoltre, le situazioni di maggiore pericolo e stress, come il verificarsi di disastri naturali o crisi, amplificano l'utilizzo dei social (19,20). Questo fenomeno assume una rilevanza maggiore, se contestualizzato nel settore salute. Infatti, la diffusione virale (vedi Glossario) di notizie ingannevoli o infondate può impattare negativamente su abitudini e stili di vita, promuovendo comportamenti e/o azioni che potrebbero rivelarsi anche dannosi, come l'uso inappropriato di farmaci, l'assunzione di rimedi o presunti tali, e modifiche della dieta o l'adozione di comportamenti psicosociali inappropriati (tra cui anche atteggiamenti di intolleranza, violenza o razzismo). Basti pensare alla riduzione nella copertura vaccinale che si è verificata negli ultimi anni e che ha determinato l'incremento dell'incidenza di malattie infettive, come il morbillo, che sarebbero state prevenibili mediante il corretto impiego dei vaccini. Il cosiddetto movimento "No Vax" ha raggiunto una tale diffusione che recentemente l'OMS ha incluso l'esitazione alla vaccinazione tra le 10 principali minacce per la salute globale (21). Altri casi recenti, che hanno catturato l'attenzione dell'opinione pubblica mondiale per la gravità delle conseguenze scaturite, sono gli oltre 5 000 casi di avvelenamento da metanolo, con centinaia di morti, che si sono verificati tra febbraio e aprile 2020 in Iran a seguito della diffusione sui social di un presunto potere curativo del metanolo nei confronti della SARS-CoV-2 (22). Allo stesso modo, negli Stati Uniti un uomo è deceduto a causa dell'ingestione di un prodotto contenente clorochina; il fatto è stato messo in relazione con le dichiarazioni da parte del Presidente Donald Trump sulla possibile utilità dell'idrossiclorochina nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 (22). Sulla

base di queste criticità, durante la Conferenza sulla Sicurezza 2020 svoltasi a Monaco, il Direttore Generale dell'OMS Tedros Adhanom Ghebreyesus, ha dichiarato: *"Non stiamo combattendo solo una pandemia; stiamo combattendo una infodemia"*, riferendosi allo tsunami di informazioni, non sempre basate su solide evidenze, che si è generato a seguito della pandemia stessa.

Un recente studio ha evidenziato che circa l'82% delle voci, informazioni e teorie complottiste relative al COVID-19 che circolavano online, nel periodo compreso tra dicembre 2019 e aprile 2020, erano false e infondate (23). Inoltre, un sondaggio condotto a Wuhan in Cina, durante il primo lockdown, ha evidenziato come il contatto stretto con individui positivi al COVID-19, associato all'utilizzo prolungato di social media per la ricerca di notizie relative alla pandemia, sia associato all'insorgenza di stati di ansia e depressione, sia nella popolazione che tra gli operatori sanitari (24).

La Scienza è, per definizione, in continua evoluzione: dall'acquisizione di nuovi dati si costruisce un passo alla volta la Conoscenza, secondo un processo di revisione continua basata sull'evidenza e l'esperienza. Durante la pandemia, la forte pressione per far fronte allo stato di emergenza mondiale ha generato una situazione in cui le conoscenze medico-scientifiche vengono acquisite in modo quasi simultaneo rispetto alla loro diffusione, non solo in ambiente medico-scientifico, ma anche a livello istituzionale e nella popolazione generale. È, dunque, mancato il tempo necessario per validare e confermare le nuove conoscenze prima della loro divulgazione, portando ad un susseguirsi di dichiarazioni e raccomandazioni, poi smentite o corrette, che non solo generano confusione ma minano anche la fiducia delle persone nelle istituzioni e nei sistemi sanitari (25-27). Si è discusso molto, ad esempio, riguardo le modalità, l'utilizzo e l'accuratezza degli esami diagnostici e dei nuovi test di screening da effettuare in laboratorio o come point-of-care, nonché della scelta dei dispositivi di protezione individuale e dei comportamenti da adottare per contenere il contagio.

La problematica della disinformazione e misinformazione in ambito sanitario, e in tutta l'infosfera in generale, è già da tempo all'attenzione delle Istituzioni e degli organismi internazionali per la promozione di iniziative e strategie di contrasto, anche per le relative implicazioni politiche (18,28). I mass media e le organizzazioni sanitarie dovrebbero cooperare per fornire una corretta informazione e, allo stesso tempo, sfruttare tecnologie avanzate, come l'elaborazione del linguaggio naturale o gli approcci di data mining, per identificare e rimuovere da tutte le piattaforme social, contenuti online privi di basi scientifiche (29,30). In questo contesto, diversi social media hanno attuato delle politiche di contrasto, con la partecipazione di organizzazioni terze di fact-checking, per il contrasto alla diffusione di notizie false.

Risulta evidente quanto la strada da percorrere sia ancora lunga e occorra un approccio multidisciplinare e

olistico, che intervenga a livello sociale, politico, sanitario e scientifico (31). Infatti, nonostante i grandi avanzamenti nella capacità di rilevamento delle notizie false, registrati anche grazie all'applicazione di sistemi di intelligenza artificiale, non è sufficiente, né risulta tecnicamente ed eticamente attuabile, un completo monitoraggio delle informazioni che circolano non solo in rete, ma anche nei media tradizionali, come la radio e la televisione.

Siamo, pertanto, di fronte ad un'importante sfida per il miglioramento della comunicazione e dell'informazione che deve essere affrontata, nel rispetto del diritto di parola e di opinione, sia attraverso l'introduzione di standard qualitativi per il miglioramento della comunicazione e dell'informazione, sia attraverso la promozione di una società che sia in grado di cooperare nel riconoscimento della disinformazione (32). In quest'ottica, le Nazioni Unite hanno recentemente promosso una campagna per la promozione della consapevolezza sulla disinformazione, richiamabile attraverso l'hashtag #TakeCareBeforeYouShare (vedi Glossario), che invita gli utenti delle piattaforme social a verificare i fatti e le fonti, prima di condividere una notizia sull'onda emotiva di quanto letto online (33). In Italia, l'Istituto Superiore di Sanità ha recentemente realizzato un portale interattivo "ISSalute" con lo scopo di promuovere la corretta informazione, contrastare le "bufale" e i falsi miti sul tema (<https://www.issalute.it/index>).

SOCIAL NETWORK: OPPORTUNITÀ DELLA COMUNITÀ GLOBALE

I social media offrono opportunità formali e informali per facilitare la comunicazione tra gli individui attraverso la formazione di reti, o "networks", in cui gli utenti si riconoscono e confrontano. Come sottolineato nelle precedenti sezioni, l'uso di questi strumenti in relazione alla salute deve essere adeguatamente vigilato al fine di ridurre i potenziali rischi. D'altra parte, se utilizzati in ambito professionale, sono uno strumento prezioso non solo per la popolazione generale, ma anche per la formazione continua richiesta al personale sanitario.

In questo contesto, sono nate reti di giovani professionisti di Medicina di Laboratorio (MdL), come ad esempio, le pagine Facebook e Instagram del GdS YS (34,35), dove vengono condivise informazioni utili come eventi, congressi, corsi di formazione, articoli, linee guida e notizie scientifiche, oltre che, naturalmente, iniziative e pubblicazioni del GdS (34,36,37). Tali pagine, in collaborazione con le segreterie delle Scuole di Specializzazione e la Segreteria SIBioC, sono state uno strumento innovativo per la promozione della prima indagine italiana sui giovani professionisti in MdL condotta nel 2019 allo scopo di focalizzare l'attenzione sulla formazione degli specializzandi in MdL e sui settori di impiego dei giovani specialisti. I risultati rappresentano il "Libro Bianco" da cui partire per promuovere la crescita dei giovani nel prossimo

decennio (38).

A livello internazionale, i collegamenti attraverso i social tra i membri delle diverse società nazionali, riunite nella Task Force per gli Young Scientists della International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC-TF-YS) (39), alimentano un dibattito vibrante e stimolante, favorendo lo scambio e il confronto immediato e continuo con il supporto delle Società e Federazioni del settore. Inoltre, la piattaforma "Lab-surfing" connette giovani in tutto il mondo e facilita gli scambi culturali in ambito professionale (40).

Infine, poiché come professionisti di MdL siamo "gestori di informazioni" e "creatori di conoscenza" (41), è responsabilità degli YS adoperarsi per diventare anche veicolo o "influencer" di una corretta informazione medica, specialmente nell'ottica di sviluppo e valorizzazione della MdL (42). La consapevolezza del crescente dilagare di fake news, anche sapientemente architettate, impone particolare attenzione nella scelta dei contenuti e delle modalità comunicative, al fine di promuovere una comunicazione corretta e consapevole su tematiche relative al settore salute in generale e, più in particolare, alla MdL.

DISCUSSIONE

La criticità dell'attuale periodo storico ha reso ancor più evidente quanto l'infosfera e le risorse informatiche siano ormai parte integrante, se non fondamentale, del nostro quotidiano. Quasi tutto è a "portata di click": il tempo, lo spazio e i contatti sono radicalmente cambiati. Anche la sanità nel suo complesso non può, quindi, prescindere dalla disponibilità di nuovi canali di comunicazione sempre più pervasivi. La sfida che si pone all'attenzione di tutti coloro che operano in ambito sanitario e scientifico è quella di cercare di essere artefici di una "medicina virtuale" di qualità e non vittime, o peggio, spettatori del fiorire della disinformazione sanitaria, per la quale la rete rappresenta certamente un terreno fertile.

La rapidità e la frammentazione delle informazioni possono, infatti, avere risvolti negativi, talvolta francamente dannosi. Le fragilità di questo sistema sono emerse in maniera drammatica in questa situazione di crisi, determinata dalla diffusione della COVID-19, che ha impattato in ogni aspetto della vita quotidiana e messo a dura prova il sistema sanitario e l'intero mondo della MdL (37,43).

L'impiego di strumenti tecnologici innovativi offre nuove opportunità, come lo sviluppo "dell'epidemiologia digitale" che permette di aiutare a identificare patologie umane emergenti, comprese le malattie infettive, molto prima rispetto agli strumenti epidemiologici tradizionali (44). La raccolta di informazioni dirette sul volume di ricerche effettuate per termini specifici ("parole chiave"), utilizzando lingue diverse, da luoghi diversi e anche in tempi diversi, ad esempio attraverso Google Trends, è uno di questi sistemi innovativi, sempre più utilizzati, e disponibili gratuitamente (45). Nel caso della COVID-19,

un'analisi in tempo reale delle ricerche effettuate, utilizzando come parole chiave i termini relativi ai sintomi più comuni della malattia, ovvero "tosse, febbre e dispnea in COVID-19", all'interno di una specifica area geografica, permette indirettamente di indagare le dinamiche della diffusione dei contagi e, potenzialmente, di prevedere l'insorgenza di nuovi possibili focolai locali (46).

La Scienza e tutti i professionisti che operano nel campo della sanità e della MdL hanno un ruolo importante in quest'ambito per elaborare strategie atte ad appiattire la curva "infodemica", arginare la diffusione di informazioni pericolose per la salute pubblica e impedirne il veloce diffondersi sulla rete. A tal proposito, un recente articolo pubblicato nella rivista "Journal of the American Medical Association", JAMA, propone quattro strategie per l'implementazione degli strumenti di informazione digitale, ossia lo sviluppo di contromisure per la disinformazione, la sorveglianza dei dati digitali, la collaborazione con piattaforme affidabili e la promozione dell'equità attraverso le stesse piattaforme (47).

Considerata l'estesa digitalizzazione della società in generale, e dell'ambito sanitario in particolare, questi aspetti saranno sempre più rilevanti e animeranno il dibattito all'interno della comunità scientifica nel prossimo futuro. È, pertanto, necessario che il ruolo del professionista di MdL tenga conto anche di aspetti legati alla comunicazione in ambito scientifico e al corretto impiego dei mezzi di comunicazione oggi disponibili, dalla selezione di fonti attendibili alla capacità di interpretare criticamente e contestualizzare in modo appropriato notizie scientifiche pubblicate online. La COVID-19 ha già interessato milioni di persone in tutto il mondo, causando oltre 90 milioni di casi alla fine di Gennaio 2021. La MdL ha fornito un contributo quasi insostituibile al percorso diagnostico-terapeutico, influenzando anche sul controllo del contagio (43); alcuni termini fino a poco tempo fa specifici di questo settore, come "test molecolare" o "test antigenico", sono ormai divenuti di uso comune, grazie ad una forte spinta da parte degli utenti a ricercare informazioni e chiarimenti su tutti i media. Il rischio è rappresentato dal potenziale crollo dell'autorevolezza delle fonti classiche, con il crollo sistemico dell'intermediazione e alla conseguente disintermediazione, base dell'infosfera, mentre è necessario programmare azioni proattive sostenute da specifiche competenze.

CONCLUSIONI

L'efficacia della comunicazione in ambito sanitario e in MdL deve tener conto dell'evoluzione dei media e del rapido sviluppo di nuove piattaforme e applicazioni a tema sanitario. La disponibilità di mezzi di comunicazione rapidi ed efficaci, come i social media, rappresenta una grande sfida ma anche un'opportunità: per comunicare in modo responsabile e credibile, infatti, è necessario instaurare una alleanza informativa, che, come per l'alleanza terapeutica, veda una stretta

collaborazione tra i protagonisti della tutela della salute del paziente.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Floridi L. The fourth revolution: how the infosphere is reshaping human reality. Oxford: Oxford University Press, 2014.
2. <https://unisobmedialab.it> (ultimo accesso: dicembre 2020).
3. Morley J, Cows J, Taddeo M, et al. Public Health in the Information Age: Recognizing the Infosphere as a Social Determinant of Health. *J Med Internet Res* 2020;22:e19311.
4. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259807/9789241550208-eng.pdf> (ultimo accesso: dicembre 2020).
5. Schulz PJ, Pessina A, Hartung U, et al. Effects of objective and subjective health literacy on patients' accurate judgment of health information and decision-making ability: survey study. *J Med Internet Res* 2021;23:e20457.
6. Wang Y, McKee M, Torbica A, et al. Systematic literature review on the spread of health-related misinformation on social media. *Soc Sci Med* 2019;240:112552.
7. Al Khaja KAJ, Al Khaja AK, Sequeira RP. Drug information, misinformation, and disinformation on social media: a content analysis study. *J Public Health Policy* 2018;39:343-57.
8. Puspitasari I, Firdauzy A. Characterizing consumer behavior in leveraging social media for e-patient and health-related activities. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16:3348.
9. Grajales FJ, Sheps S, Ho K, et al. Social media: A review and tutorial of applications in medicine and health care. *J Med Internet Res* 2014;16:e13.
10. Househ M, Borycki E, Kushniruk A. Empowering patients through social media: The benefits and challenges. *Health Inform J* 2014;20:50-8.
11. Song H, Omori K, Kim J, et al. Trusting social media as a source of health information: Online surveys comparing the United States, Korea, and Hong Kong. *J Med Internet Res* 2016;18:e25.
12. Ventola CL. Social media and health care professionals: benefits, risks, and best practices. *P T* 2014 ;39:491-520.
13. Xie LF, Itzkovitz A, Roy-Fleming A, et al. Understanding self-guided web-based educational interventions for patients with chronic health conditions: systematic review of intervention features and adherence. *J Med Internet Res* 2020;22:18355.
14. Hansen LK, Arvidsson A, Nielsen FA, et al. Good Friends, Bad News - Affect and virality in twitter. In: James J. Park JJ, Yang LT, Lee C eds. *Future Information Technology. Communications in Computer and Information Science*, 2011;185: 34-43.
15. Ohno-Machado L. Understanding and mitigating the digital divide in health care. *J Am Med Inform Assoc* 2017;24:881.
16. Berardi M. Lab Tests Online: un successo che parte da lontano. *Biochim Clin* 2019;43:245-7.
17. Berardi M, Messeri G. Lab Tests Online Italia, oggi. *Biochim Clin* 2020;44:106-7.
18. Nadasan V. The quality of online health-related information - an emergent consumer health issue. *Acta Medica Marisensis* 2016;62:408-21.

19. Niles MT, Emery BF, Reagan AJ, et al. Social media usage patterns during natural hazards. *PLoS One* 2019;14:e0210484.
20. Gottlieb M, Dyer S. Information and Disinformation: Social Media in the COVID-19 Crisis. *Acad Emerg Med* 2020;27:640-1.
21. Carrieri V, Madio L, Principe F. Vaccine hesitancy and (fake) news: Quasi-experimental evidence from Italy. *Health Economics* 2019;28:1377-82.
22. <https://unfoundation.org/blog/post/immunizing-the-public-against-misinformation/> (Ultimo accesso dicembre 2020).
23. Islam MS, Sarkar T, Khan SH, et al. COVID-19-related infodemic and its impact on public health: a global social media analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2020;103:1621-9.
24. Ni MY, Yang L, Leung CMC, et al. Mental health, risk factors, and social media use during the COVID-19 epidemic and cordon sanitaire among the community and health professionals in Wuhan, China: Cross-Sectional Survey. *JMIR Ment Health* 2020;7:e19009.
25. The COVID-19 infodemic (Editorial). *Lancet Infect Dis* 2020;20:875.
26. Orso D, Federici N, Copetti R, et al. Infodemic and the spread of fake news in the COVID-19-era. *Eur J Emerg Med* 2020;27:327-8.
27. Moscadelli A, Alhora G, Biamonte MA, et al. Fake news and COVID-19 in Italy: results of a quantitative observational study. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:5850.
28. Zarocostas J. How to fight an infodemic. *The Lancet* 2020;395:676.
29. Shu K, Sliva A, Wang S, et al. Fake news detection on social media: a data mining perspective. *SIGKDD Explor* 2017;19:22-36.
30. Tasnim S, Hossain MM, Mazumder H. Impact of rumors and misinformation on COVID-19 in social media. *J Prev Med Public Health* 2020;53:171-4.
31. Lazer DMJ, Baum MA, Benkler Y et al. The science of fake news. *Science* 2020;359:1094-6.
32. Diviani N, van den Putte B, Giani S, et al. Low Health Literacy and Evaluation of Online Health Information: A Systematic Review of the Literature. *J Med Internet Res* 2015;17:e112.
33. <https://en.unesco.org/news/pause-take-care-you-share> (ultimo accesso: dicembre 2020).
34. Sancesario G, Perrone MA, Pellegrini C, et al. La medicina di laboratorio: gli specialisti di domani. *Biochim Clin* 2019;43:424-34.
35. Sancesario G, Perrone MA, Aita A, et al. Education and training for young scientists: Two years' experience of the Italian Society of Clinical Chemistry Young Scientists Working Group (SIBIOC YS-WG). *Clin Chim Acta* 2019;493:S311-6.
36. Bellini C, Berardi M, Nannini S et al. Il "libro bianco" dei giovani professionisti di medicina di laboratorio: risultati dell'indagine del gruppo di studio (GdS) SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2018;43(SS1):S141.
37. Ammirabile M, Aita A, Bartolini A, et al. Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020;44:21-2.
38. Bellini C, Nannini S, Berardi M, et al. per il gruppo di Studio SIBioC Young Scientists. Il "Libro Bianco" dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell'indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020;44:351-8.
39. <https://www.ifcc.org/task-force-young-scientists-tf-ys/> (ultimo accesso: dicembre 2020).
40. <https://www.lab-surfing.com> (ultimo accesso: dicembre 2020).
41. Kroft SH. The Evolution of the Clinical Pathologist. *Am J Clin Pathol* 2018;150:283-4.
42. Plebani M. Il futuro della Medicina di Laboratorio: un Manifesto per i suoi professionisti. *Biochim Clin* 2020;44:263-9.
43. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomed* 2020;91:137-45.
44. Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Is digital epidemiology the future of clinical epidemiology? *J Epidemiol Glob Health* 2019;9:146.
45. Cervellin G, Comelli I, Lippi G. Is Google Trends a reliable tool for digital epidemiology? Insights from different clinical settings. *J Epidemiol Glob Health* 2017;7:185-9.
46. Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Google search volume predicts the emergence of COVID-19 outbreaks. *Acta Biomed* 2020;91:e2020006.
47. Merchant RM, South EC, Lurie N. Public Health Messaging in an Era of Social Media. *JAMA* 2021 doi: 10.1001/jama.2020.24514.

GLOSSARIO

| | |
|---|--|
| Analisi SWOT | strumento di pianificazione che valuta punti di forza, debolezze, opportunità e rischi di un progetto o di una situazione al fine di definire le azioni da intraprendere per raggiungere l'obiettivo preposto |
| Disinformazione | tipo di informazione volutamente ingannevole con scopi, generalmente, manipolatori dell'opinione pubblica |
| Disturbo dell'informazione (information disorder) | il contenuto, lo scopo e l'entità della diffusione di informazioni fuorvianti |
| Echo chambers | amplificazione di informazioni o idee in seguito alla loro ripetizione e ritrasmissione all'interno di un sistema definito |
| Hashtag | tipo di parola chiave comunemente utilizzato da alcune piattaforme di social media al fine di indicare un oggetto e renderlo facilmente rintracciabile da altri utenti interessati ad una tematica |
| Infodemia (infodemic) | dall'inglese "infodemic", a sua volta composto dai sostantivi information ed epidemic, abbondanza di informazioni con livelli di accuratezza ed affidabilità estremamente variabili che rendono difficile per un individuo selezionare fonti affidabili su un argomento quando ne ha bisogno |
| Information Technology (IT) | insieme delle metodologie utilizzate per l'analisi e l'archiviazione di dati ed informazioni |
| Infosfera | insieme dei mezzi di comunicazione e delle informazioni da essi prodotte |
| Misinformazione | informazione falsa diffusa allo scopo di rendere virale un contenuto privo di attinenza con fatti reali |
| Notizie false (Fake news) | terminologia che si riferisce ad articoli o notizie pubblicate sui social media inventate, ingannevoli o distorte che hanno lo scopo di creare disinformazione |
| Social Media | termine generico che indica l'insieme delle piattaforme digitali online che permettono agli utenti di condividere contenuti di varia natura (testo, audio, video, foto) |
| Sovraccarico informativo (Information overload) | fenomeno per cui l'elevata quantità di informazioni ricevute rende difficile focalizzare l'attenzione e prendere decisioni |
| Virale | notizia che si diffonde molto rapidamente attraverso le piattaforme di social media |

Ricerca sul materiale biologico: ritorno al futuro

Giulia Sancesario^{1,2}, Paola Pezzati³

¹Biobanca, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

²Neuroscienze Sperimentali, Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Roma

³SOD Sicurezza e Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze

ABSTRACT

Research on biological material: back to the future.

Research using biological specimens and health data can accelerate the understanding of many diseases and the effectiveness of preventive, diagnostic and therapeutic interventions. However, researchers have to make a great effort to guarantee respect for transparency and protection of sensitive data of patients, or more generally, of donors whose biological material is collected and stored for future research purposes. Recently, the Committee of Ministers of the Council of Europe proposed new recommendations for the use of biological materials of human origin for future research purposes. The Recommendation CM/Rec(2016)6 focuses on the safeguarding of fundamental rights of the persons, whose biological materials are stored for biomedical research, with particular regard to frail people, unable to provide consent, to guarantee their dignity, integrity and privacy. Furthermore, attention is paid to the transfer of material and data, to the transparency of access policies and to the security in the governance of the collections, in a dimension of globalization and internationalization of research that is a powerful tool to improve human health and healthcare systems.

Parole chiave: biobanche, consenso informato, trattamento dei dati

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'enorme sviluppo tecnologico ha cambiato radicalmente la ricerca biomedica, portando ad un livello di diffusione senza precedenti di tecnologie ad alto rendimento (high throughput), piattaforme omiche, analisi di Big Data, fino alla possibile applicazione dell'intelligenza artificiale, algoritmi di apprendimento profondo (deep learning) per la diagnosi e la prevenzione delle malattie. Di pari passo, è aumentata la richiesta di collezioni di materiale biologico dei pazienti, che siano di elevata qualità e ben caratterizzati clinicamente, laddove anche la raccolta di materiale negli individui asintomatici o nei pazienti in fase preclinica, ovvero che non hanno ancora la manifestazione della malattia, favorisce la ricerca traslazionale futura, e la sfida di riuscire a prevenire o riconoscere le patologie nelle fasi

precoci. Vista la forte spinta verso l'innovazione, sono state istituite numerose Biobanche e infrastrutture per la condivisione di materiale biologico, che hanno come obiettivo la raccolta di materiale e di dati che potranno essere impiegati in studi basati su tecnologie di recente sviluppo e concezione. Questo pone numerosi problemi etici legati alla conservazione del materiale, e soprattutto dei dati sensibili, che sono stati oggetto della recente Raccomandazione del Comitato dei Ministri del Consiglio d'Europa. Come è possibile garantire che l'impiego non solo del materiale biologico, ma anche la conservazione e il trasferimento dei dati raccolti, siano conformi al consenso e all'autorizzazione originale data dal donatore? Per i ricercatori, in quanto garanti della privacy dei pazienti, questo rappresenta un punto cruciale che unisce etica, legislazione e progresso per la salute pubblica.

Corrispondenza a: Giulia Maria Sancesario, Biobanca - IRCCS Fondazione Santa Lucia, Via Ardeatina 354, Roma, Tel 06 501703116, E-mail g.sancesario@hsantalucia.it

Ricevuto: 11.05.2021

Revisionato: 08.06.2021

Accettato: 09.06.2021

Pubblicato on-line: 06.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.053

PUNTI SALIENTI

Principi di trasparenza e tutela del trattamento dei dati

La trasparenza e la tutela dei dati personali sono principi essenziali per l'individuo, soprattutto in ambito sanitario dove si intrecciano bene individuale del paziente e bene collettivo, più generalmente inteso come ricerca biomedica, progresso scientifico e salute. Questo è un punto cruciale al quale hanno dedicato molta attenzione diversi documenti e normative, le quali partendo dal notevole contributo rappresentato dalle ricerche effettuate con l'impiego del materiale biologico per la promozione della salute e della conoscenza, antepongono l'interesse e il benessere della persona dinanzi a quello generale della società o della scienza. Questo non limita i campi di azione del ricercatore, ma stabilisce una cooperazione in cui l'individuo che dona il proprio materiale biologico, e autorizza il trattamento dei suoi dati, definisce gli ambiti nei quali essi potranno essere impiegati, trasferiti o condivisi, conservando il diritto di poter modificare, aggiornare i dati, o anche di revocare il consenso in qualsiasi momento. In questo contesto, la Raccomandazione CM/Rec(2016)6 (1) della Commissione dei Ministri del Consiglio d'Europa agli Stati Membri, la cui traduzione è inclusa in questo fascicolo di *Biochimica Clinica*, disciplina le procedure per l'acquisizione e l'utilizzo di campioni biologici di origine umana e dei dati associati per le ricerche future, enfatizzando il valore di principi come la riservatezza e la trasparenza, con un particolare riguardo verso le persone fragili, non in grado di fornire il consenso. Inoltre, in una dimensione di globalizzazione e internazionalizzazione della ricerca, viene posta l'attenzione al trasferimento del materiale e dei dati, anche con i Paesi esteri, alla trasparenza delle politiche di accesso, e alla sicurezza nella gestione delle collezioni.

Utilizzo di campioni biologici di origine umana per futuri studi di ricerca

Già nel 2006, la Commissione dei Ministri del Consiglio d'Europa ha definito le prime Raccomandazioni per l'acquisizione di campioni biologici di origine umana destinati alla conservazione per scopi di ricerca in campo sanitario (2,3). Le raccolte, sia di materiale residuo dalle indagini diagnostiche sia ottenuto e conservato per finalità di ricerca nelle biobanche, sono accompagnate nella maggior parte dei casi da dati personali riferiti al donatore, definiti sensibili in quanto comprendono informazioni che possono includere o essere collegati a informazioni su genealogia, stili di vita, informazioni cliniche. Mentre nel caso delle collezioni, il materiale e i dati associati vengono raccolti e conservati per finalità specifiche, relative ad un progetto già definito, nel caso delle biobanche, la conservazione prevede un futuro impiego, e deve pertanto essere gestita secondo specifiche indicazioni, fornite all'atto del consenso dal donatore del materiale (Tabella 1) (4).

In seguito al grande sviluppo delle biobanche e, soprattutto, della ricerca trans-disciplinare e internazionale, con la nascita di infrastrutture che raccolgono e condividono campioni e dati anche oltre i confini nazionali, sono emerse nuove criticità per la gestione e la sicurezza. Inoltre, la crescita della ricerca biomedica nel campo della genetica, ha aumentato le questioni riguardanti la tutela della privacy, e quindi la necessità di garantire un'adeguata protezione dei dati personali, in conformità con i principi di protezione dei dati, come già stabilito dalla Convenzione per la Protezione delle Persone riguardo il Trattamento Automatizzato dei Dati Personali (ETS No.108).

Per venire incontro a queste nuove esigenze, nel 2016 le Raccomandazioni sono state riviste con l'obiettivo di garantire nel tempo la salvaguardia dei

Tabella 1

Consenso per la raccolta e conservazione di materiale biologico e dati per usi futuri, multipli e non definiti

Il consenso è valido solo se le persone interessate sono state adeguatamente informate in merito a:

- lo scopo della banca dati sanitaria o della biobanca;
- i rischi e gli oneri associati alla raccolta, archiviazione e utilizzo di dati e materiale;
- la natura dei dati o del materiale da raccogliere;
- le procedure per la restituzione dei risultati, inclusi i risultati incidentali;
- le regole di accesso alla Banca Dati Sanitaria o alla Biobanca;
- le modalità di protezione della privacy;
- gli accordi di gestione;
- nel caso di dati e materiale resi non identificabili, l'individuo potrebbe non conoscere l'utilizzo dei propri dati/materiale e non avrà la possibilità di revocare il proprio consenso;
- i loro diritti e garanzie fondamentali;
- l'eventuale uso commerciale e la condivisione dei vantaggi, questioni di proprietà intellettuale e di trasferimento di dati o di materiale ad altre istituzioni o paesi terzi.

Traduzione da Dichiarazione dell'Associazione medica di Taipei sulle considerazioni etiche relative alle banche dati e alle biobanche sanitarie (modificata da rif 4).

diritti fondamentali delle persone il cui materiale biologico viene acquisito e conservato per futuri scopi di ricerca (1). Per il responsabile del trattamento, per il ricercatore, e per tutti coloro che hanno accesso al materiale e ai dati, viene introdotto l'obbligo di garantire la "riservatezza", ovvero la protezione delle informazioni di natura personale, raccolte al momento dell'acquisizione oppure ottenute successivamente, mediante indagine e ricerca sul materiale. Un elemento molto importante è l'estensione della tutela, oltre che durante l'acquisizione, la conservazione e l'uso, anche durante il trasferimento del materiale biologico (art. 7). Se da una parte, infatti, occorre garantire dignità, integrità e riservatezza dei soggetti coinvolti (art. 8), dall'altra è necessario favorire l'accesso dei ricercatori al materiale biologico, con politiche trasparenti e che puntino alla massimizzazione del valore, sempre garantendo la supervisione e la tracciabilità dell'uso dei materiali (art. 18).

La gestione delle collezioni è un tema centrale nel documento che, in particolare, enfatizza il valore dei principi di trasparenza e responsabilità (Capitolo III): il donatore deve ricevere tutte le informazioni su come verranno impiegati i dati e il materiale nelle ricerche future, e potrà effettuare possibili scelte a riguardo. È indispensabile quindi che il proponente (o il ricercatore) fornisca in modo comprensibile e preciso le informazioni su quelle che saranno le politiche per l'accesso al materiale, per eventuali trasferimenti, i diritti e le garanzie per il donatore; in particolare, il donatore potrà, in ogni momento, esercitare il diritto di revocare il consenso. Altra importante novità del documento, è l'attenzione rispetto agli individui fragili, ovvero quelle persone che secondo la legge non sono in grado di prestare il consenso (art. 11 e 12). Infatti, mentre per tutti i donatori in grado di fornire il consenso, l'acquisizione di materiale avviene per un possibile interesse individuale, per coloro che non ne sono in grado, in assenza di un vantaggio diretto per la persona stessa, possono sussistere vantaggi per altre persone, della stessa fascia di età o affetti dalla stessa patologia, a condizione che gli scopi della ricerca non possano essere raggiunti con materiale di persone in grado di fornire il consenso. Tuttavia, la Raccomandazione prevede che le persone che non sono in grado di fornire il consenso, dovranno essere informate in modo adeguato alla loro comprensione, e, nel caso di minori, la loro opinione deve essere presa in considerazione in proporzione all'età e al grado di maturità. Per i pazienti fragili, ogni obiezione o desiderio espressi in precedenza al loro stato di fragilità dovrebbero comunque essere tenuti in considerazione, anche nei casi in cui il materiale biologico venga prelevato *post mortem* (art. 14). Infine, proprio considerando il consenso come un dialogo dinamico nel tempo tra il donatore e il ricercatore o responsabile del trattamento, qualora una persona ottenga o riacquisti la capacità di fornire il consenso, è necessario compiere ragionevoli sforzi per ottenere il consenso all'utilizzo del materiale già acquisito.

Protezione dei dati personali e ricerca scientifica

La ricerca traslazionale si basa sullo studio del materiale di origine umana, per trasferire o indagare *ex vivo* i risultati ottenuti su modelli sperimentali. Oltre al profilo biologico, l'analisi di una quantità infinita di informazioni che provengono dai dati relativi alla salute dell'individuo, apre notevoli opportunità per lo sviluppo di terapie personalizzate, o per comprendere meglio i meccanismi delle malattie, o per progredire nelle tecniche diagnostiche specialistiche. Data l'importanza che assumono quindi i dati per la ricerca in ambito sanitario, è necessario garantire un utilizzo rispettoso dei principi etici di protezione dei dati personali, prevedendo ad esempio che i progetti di ricerca siano concepiti fin dalla progettazione, o dalla definizione del disegno sperimentale (*by-design*), tenendo in considerazione il rispetto etico nei confronti dei dati che vengono impiegati. Nello stesso anno della Raccomandazione, il Parlamento Europeo ha approvato il Regolamento Generale sulla Protezione dei Dati (UE) n. 2016/679 (GDPR), (5) che stabilisce le norme relative alla protezione delle persone fisiche, con particolare riguardo al trattamento dei dati personali e alla libera circolazione di tali dati. Il GDPR si fonda su sei principi che regolano la raccolta e il trattamento di dati personali, ovvero legalità-correttezza-trasparenza, definizione dei limiti della finalità e del tempo di conservazione, minimizzazione dei dati, precisione, integrità e riservatezza.

A questi principi si aggiunge un settimo, la responsabilità (*accountability*), che obbliga a documentare come tutti i principi vengano rispettati (Figura 1). Tuttavia, in alcune circostanze come nel caso della ricerca scientifica, il GDPR presuppone l'esistenza di norme etiche e professionali che disciplinano la ricerca biomedica sull'uomo, e che possono quindi giustificare adeguamenti o deroghe ai principi generali. Questa flessibilità è concessa in quanto la ricerca che si svolge in un quadro etico conserva, in linea di principio, l'interesse pubblico, ovvero la salute, e permette quindi al ricercatore di accedere e utilizzare i dati per studi eticamente corretti.

Nel 2020, il Garante Europeo della protezione dei dati (European Data Protection Supervisor - EDPS), l'autorità europea che vigila sul rispetto della protezione dei dati, ha affrontato il tema della protezione nell'ambito della ricerca scientifica (6). Secondo l'EDPS, il rispetto dei dati personali è del tutto compatibile con una ricerca responsabile, e la protezione dei dati rappresenta un sistema di sicurezza per i donatori e per le persone i cui dati sono necessari per favorire la ricerca. I ricercatori che operano all'interno di contesti di gestione etica, con una approvazione e una base giuridica valida, dovrebbero quindi essere in grado di accedere a tutti i dati necessari per condurre studi per il mantenimento della salute, adottando adeguati sistemi di salvaguardia per garantire la tutela dei dati. Infine, secondo l'EDPS per

Definizione e limiti del tempo di conservazione:

deve essere definito il periodo per la conservazione, dopo il quale i campioni biologici devono essere distrutti e i dati associati aggregati o anonimizzati

Precisione:

per tutti i dati e campioni conservati

Minimizzazione dei dati:

solo i dati necessari possono essere raccolti e condivisi

Responsabilità:

deve essere dimostrata la conformità a tutti i principi di protezione



Legalità, correttezza e trasparenza:

I donatori devono comprendere come verranno utilizzati i dati e le finalità della raccolta

Definizione e limiti della finalità:

l'uso di dati e campioni è limitato esclusivamente agli scopi autorizzati dal donatore nel consenso

Integrità e riservatezza:

protezione di tutti i dati dalla diffusione incontrollata

Figura 1

Regolamento Europeo per la Protezione dei Dati (GDPR) e ricerca in ambito sanitario.

il settore sanitario esiste un “imperativo etico e scientifico” di condividere i dati personali a fini di ricerca (6).

Tutte le norme europee quindi convergono nel riconoscere un mutuo rapporto di fiducia tra il ricercatore e il donatore, definendo i termini entro i quali i donatori autorizzano (o non autorizzano) i diversi ambiti di utilizzo e trasferimento dei dati. È importante, per il ricercatore, adottare ogni misura per una gestione conforme sia del materiale, sia dei dati, attraverso procedure trasparenti e documentate, soprattutto quando le raccolte avvengono nel contesto delle biobanche, e quindi implicano un impiego futuro.

La costituzione di una biobanca per la conservazione e l'utilizzo dei campioni biologici e dei dati associati è stata recentemente regolamentata dalla norma UNI ISO 20387:2019 (Biobanking-General requirements for biobanking) (7). Tale nuova norma va ad indicare le modalità che devono essere seguite nelle diverse fasi di acquisizione e conservazione, unitamente alle attività relative a raccolta, preparazione, preservazione, prova, analisi e distribuzione dei campioni e delle informazioni associate. Inoltre, la norma 20387 comprende requisiti generali per il funzionamento, la competenza e imparzialità del personale, per il controllo della qualità nell'ottica di garantire l'adeguatezza dei materiali biologici e dei dati associati. L'integrazione del sistema di gestione della qualità per la conservazione del materiale biologico, con gli adempimenti necessari per la protezione dei dati personali (ovvero il GDPR), forniscono le condizioni essenziali per permettere la ricerca in ambito biomedico e il progresso scientifico.

IL MATERIALE BIOLOGICO DURANTE LA PANDEMIA DA COVID-19

Nell'ultimo anno, la diffusione della malattia da Coronavirus-19 (COVID-19) ha stravolto l'intero sistema sociale ed economico mondiale, coinvolgendo in modo particolare il sistema sanitario, la ricerca e la diagnostica di laboratorio, impegnate in prima linea per il contenimento dell'emergenza (8). Il materiale biologico raccolto da pazienti, da guariti, e dalla popolazione generale, costituisce un indispensabile strumento per la ricerca, per indagare i meccanismi di azione del virus, per sviluppare nuovi sistemi diagnostici o di screening, e soprattutto vaccini e terapie efficaci. Tuttavia, pur nell'attuale situazione di emergenza, durante la quale il materiale biologico residuo dalle indagini diagnostiche o raccolto *ad hoc* è stato oggetto di raccolta e studio, è essenziale assicurare la tutela di diritti delle persone alle quali si riferiscono i campioni biologici, i dati personali, quelli sanitari e relativi allo stile di vita (9). In casi di emergenza, a causa dello stato clinico del paziente, è possibile ottenere la firma del consenso informato anche successivamente rispetto alla raccolta del materiale, da parte del tutore, o del paziente qualora ne riacquisti la capacità. Questa condizione è indispensabile per conservare nel tempo i campioni raccolti, poterli collegare ai dati personali dell'individuo a cui appartengono, per sviluppare tutte le azioni di ricerca collaborativa necessarie per gli studi futuri sulla COVID-19. Infatti, qualora fosse impossibile recuperare il consenso informato, bisognerà ricorrere all'anonimizzazione e distruzione del materiale una volta raggiunte le finalità per cui era stato raccolto, ovvero l'indagine diagnostica (10).

Tabella 2

Punti chiave nell'organizzazione di raccolte di materiale biologico per studi futuri, anche in condizioni di emergenza

| | |
|---|--|
| Riservatezza | <p>Il ricercatore deve garantire la protezione delle informazioni di natura personale:</p> <ul style="list-style-type: none"> - raccolte al momento dell'acquisizione, della conservazione e dell'uso; - ottenute successivamente, mediante indagine e ricerca, nel momento in cui il materiale viene utilizzato; - nelle fasi di raccolta, conservazione e trasferimento del materiale biologico. |
| Consenso informato | <p>Se la persona è in grado di prestare il consenso:</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'acquisizione di materiale avviene per un possibile interesse individuale. <p>Se la persona non è in grado di prestare il consenso:</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'acquisizione può avvenire se sussistono vantaggi per altre persone, della stessa fascia di età o affetti dalla stessa patologia; - gli scopi della ricerca non possono essere raggiunti con materiale di persone in grado di fornire il consenso; - sarà necessario fornire informazioni in modo compatibile con la sua comprensione, e nel caso di minori, la loro opinione deve essere considerata in proporzione all'età e al grado di maturità; - ogni obiezione o desiderio espresso in precedenza allo stato di incapacità, dovrebbe comunque essere tenuto in considerazione, anche nei casi in cui il materiale biologico venga prelevato <i>post mortem</i>; - qualora una persona ottenga o riacquisti la capacità di fornire il consenso, è necessario compiere ragionevoli sforzi per ottenere il consenso all'utilizzo del materiale già acquisito. |
| Protezione dei dati personali | <p>In accordo con il Regolamento Generale sulla Protezione dei Dati (UE) n. 2016/679, il ricercatore che utilizza i dati dei donatori del materiale biologico, deve operare in accordo ai principi di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - liceità-correttezza-trasparenza; - definizione e limiti della finalità; - minimizzazione dei dati; - accuratezza; - definizione e limiti del tempo di conservazione; - integrità e riservatezza; - responsabilità (accountability). |
| Standardizzazione, qualità | <p>Norma UNI ISO 20387 stabilisce i requisiti per le biobanche nel rispetto di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - legalità, correttezza e trasparenza: i donatori devono comprendere come verranno utilizzati i dati e le finalità della raccolta; - definizione e limiti dello scopo: l'uso di dati e dei campioni è limitato esclusivamente agli scopi autorizzati dal donatore nel consenso; - integrità e riservatezza: protezione di tutti i dati dalla diffusione incontrollata o al di fuori degli ambiti autorizzati dal donatore; - responsabilità: la biobanca deve dimostrare la conformità a tutti i principi di protezione dei dati - minimizzazione dei dati: è possibile raccogliere e condividere solo i dati necessari per uno specifico scopo; - precisione: per tutti i dati e campioni memorizzati; - definizione e limiti del tempo di conservazione: deve essere definito il periodo per la conservazione, dopo il quale i campioni biologici devono essere distrutti e i dati associati aggregati o anonimizzati. |
| Raccolta materiale in condizioni di emergenza | <p>Per conservare nel tempo i campioni raccolti, poterli collegare ai dati personali dell'individuo a cui appartengono, si precisa che:</p> <ul style="list-style-type: none"> - la firma del consenso informato può essere ottenuta anche successivamente rispetto alla raccolta del materiale, a causa dello stato clinico del paziente; - è indispensabile ricevere dal tutore, o dal paziente qualora ne riacquisti la capacità, l'autorizzazione al trattamento dei dati e alla conservazione del materiale biologico già raccolto per finalità di ricerca e per studi futuri; - qualora fosse impossibile recuperare il consenso informato, bisognerà ricorrere all'anonimizzazione e distruzione del materiale al termine dello svolgimento delle finalità per cui era stato raccolto. |

DISCUSSIONE

Nei prossimi anni, nuovi sistemi ancora più sofisticati, ultrasensibili, basati su tecnologie emergenti cambieranno il nostro approccio allo studio delle malattie. La rapida rivoluzione digitale ha portato inoltre ad un cambiamento della disponibilità e dell'uso dei nostri dati, che può rivelarsi potenzialmente molto dannoso se effettuato in modo errato, ad esempio, quando la diffusione avviene in modo incontrollato. Le tecnologie sanitarie impiegate nelle piattaforme sociali, o lo scambio di dati per finalità di studio in ambito scientifico, devono necessariamente avvalersi di protocolli di sicurezza, in quanto i dispositivi non sono sempre crittografati dagli utenti, che potrebbero operare su reti non protette (11).

La ricerca che utilizza banche dati sanitarie e biobanche può spesso accelerare in modo significativo il miglioramento delle conoscenze sulle condizioni di salute, sulle malattie e sull'efficacia, sicurezza e qualità degli interventi preventivi, diagnostici e terapeutici (4). La ricerca sanitaria rappresenta un bene per i singoli pazienti, la popolazione e la società, ma apre criticità e rischi relativamente a dignità, privacy, riservatezza, fino alla possibile discriminazione delle persone.

Sia che si tratti di biobanche strutturate che di collezioni di materiale biologico per finalità di ricerca, anche istituite in condizioni di emergenza, come ad esempio durante la pandemia da COVID-19, non si può prescindere dal rispetto dei requisiti etico-legali a garanzia della persona che dona il materiale biologico, che deve essere invece riconosciuta e inclusa come partecipante consapevole (12). I ricercatori che operano nel campo della medicina di laboratorio hanno obblighi specifici, sia etici che legali, di proteggere le informazioni fornite loro dai pazienti; d'altra parte, i pazienti hanno il diritto di esercitare il controllo sull'uso dei propri dati personali e del materiale biologico (Tabella 2). Questo dovrebbe essere esteso anche alle ricerche che utilizzano i campioni residuali, il cui impiego sebbene non implichi un danno diretto per il paziente, necessita di un consenso informato modulato sulle diverse esigenze di ricerca o di altro uso (2).

Il consenso informato è una salvaguardia per offrire agli individui più controllo e scelta riguardo alla propria privacy, e per sostenere la fiducia della società nella scienza e nel progresso della medicina traslazionale, attraverso l'utilizzo di materiale biologico e dei dati. Nel consenso, il donatore, così come il ricercatore, hanno la possibilità nel tempo di arricchire con ulteriori dati il campione inizialmente raccolto.

Il lavoro del ricercatore, pertanto, oltre che basarsi su una solida idea condivisa di integrità, e sul concetto che l'adozione di una condotta etica e onesta, unita all'utilizzo di metodologie consolidate e ad una rigorosa revisione tra pari, sia necessaria per produrre risultati affidabili, riproducibili e verificabili (13), deve essere volto a garantire la tutela dei diritti delle persone alle quali si riferiscono i campioni biologici e i dati personali, che vengono "donati" e impiegati negli studi e nelle ricerche scientifiche (10) presenti e future.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Recommendation CM/Rec(2016)6 of the Committee of Ministers to member States on research on biological materials of human origin (https://search.coe.int/cm/Pages/result_details.aspx?ObjectId=090000168064e8ff ultimo accesso: maggio 2021).
2. Pezzati P, Graziani MS. Bioetica ed uso dei campioni biologici umani. *Biochim Clin* 2008;32:186-91.
3. Recommendation (Rec 2006/4) of the Committee of Ministers to Member States on Research on Biological Materials of Human Origin. (https://search.coe.int/cm/Pages/result_details.aspx?ObjectId=09000016805d84de ultimo accesso: maggio 2021).
4. Dichiarazione dell'Associazione medica di Taipei sulle considerazioni etiche relative alle banche dati e alle biobanche sanitarie 67 Assemblea Generale, Taipei, Taiwan, Ottobre 2016. (<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-taipei-on-ethical-considerations-regarding-health-databases-and-biobanks/>). Ultimo accesso: maggio 2021.
5. Regolamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 aprile 2016, relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali, nonché alla libera circolazione di tali dati e che abroga la direttiva 95/46/CE (regolamento generale sulla protezione dei dati, GDPR) (GU L 119 del 4.5.2016). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0679> Ultimo accesso: maggio 2021.
6. Regolamento (UE) 2018/1725 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2018, relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali da parte delle istituzioni, organi e organismi dell'Unione e alla libera circolazione di tali dati. (https://edps.europa.eu/sites/edp/files/publication/regulati_on_eu_2018_1725_it.pdf). Ultimo accesso: maggio 2021.
7. ISO 20387:2018 Biobanking-General requirements. International Organisation for Standardisation. Geneva 2018.
8. 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.
9. Ammirabile M, Aita A, Bartolini A, et al. Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020;44:21-2.
10. Gruppo di lavoro ISS Ricerca traslazionale COVID-19. Raccomandazioni per raccolta, trasporto e conservazione di campioni biologici COVID-19. Versione del 15 aprile 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporto ISS COVID-19, n. 13/2020). (https://www.iss.it/documents/20126/0/Rapporto+ISS+COVID-19+n.13_2020+campioni+biologici.pdf/50ee1f09-45df-c7a9-9dd4-26c2332f9ce9?t=1587107214457). Ultimo accesso: maggio 2021.
11. D'Argenio V, Iorio E, Tomaiuolo, et al. Comunicare nell'infosfera: sfide e opportunità per la Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2021;45:xx-xx
12. A cura di Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) "Il materiale biologico IRCCS" Collana Bussole IRCCS, n. 1, settembre 2020.
13. Szomszor M, Quaderi N. Global Research Report Research Integrity: Understanding our shared responsibility for a sustainable scholarly ecosystem. Institute for Scientific Information. Traduzione di Biancalani F. *Biochim Clin* 2021;45:196-210.

Raccomandazione CM/Rec(2016)6 della Commissione dei Ministri agli Stati Membri sull'utilizzo di campioni biologici di origine umana per scopi di ricerca (Adottata dalla Commissione dei Ministri l'11 maggio 2016 al 1256° incontro dei Delegati dei Ministri)

Presentazione e traduzione a cura di: Giulia Sancesario (Roma), Paola Pezzati (Firenze)

PRESENTAZIONE

Nell'ambito delle tematiche etiche in Medicina di Laboratorio che Biochimica Clinica ha deciso di presentare quest'anno, viene resa disponibile in lingua Italiana la Raccomandazione del Comitato dei Ministri del Consiglio Europeo riguardante l'impiego di materiali biologici di origine umana in ambito clinico e di ricerca biomedica.

I materiali biologici destinati ad essere utilizzati ai fini di ricerca dovrebbero essere acquisiti, conservati e usati solo in modo strutturato e in conformità ai principi stabiliti nella presente raccomandazione. Dal punto di vista etico e deontologico, particolare importanza è data alla Riservatezza, e al diritto nel tempo di salvaguardare i diritti fondamentali delle persone il cui materiale biologico viene acquisito e conservato per futuri scopi di ricerca, temi trattati in maniera più approfondita rispetto alla Raccomandazione precedente (Raccomandazione Rec(2006)4) (già pubblicata e commentata su Biochimica Clinica nel 2008 - Biochim Clin 2008;32:186-94). Nuovi aspetti riguardano la tutela dei soggetti fragili, l'adozione di misure di controllo e di sicurezza, di modalità per facilitare l'accesso del pubblico alle informazioni generali sulla natura e sull'obiettivo delle raccolte di materiali a scopo di ricerca e sull'adozione di politiche sulla gestione di risultati rilevanti per la salute delle persone derivanti dall'uso dei loro materiali biologici.

PREAMBOLO

Il Comitato dei Ministri, in base all'articolo 15.b dello Statuto del Consiglio di Europa:

- considerando che lo scopo del Consiglio di Europa è di realizzare un'unione più stretta fra i suoi Membri e che uno dei mezzi per raggiungere questo scopo è la tutela e lo sviluppo dei Diritti e delle Libertà Fondamentali dell'individuo;
- considerando che uno degli scopi della Convenzione per la Protezione dei Diritti Umani e delle Libertà Fondamentali (ETS N° 5) è la tutela della vita privata;
- considerando che lo scopo della Convenzione sui Diritti Umani e Biomedicina (ETS N° 164) e del relativo Protocollo Aggiuntivo sulla ricerca biomedica (CETS N° 195), come definito dall'articolo 1 di entrambi i documenti, è la protezione della dignità e identità di tutti gli esseri umani e la tutela per ognuno, senza discriminazione, della integrità personale e degli altri Diritti e Libertà Fondamentali rispetto alle applicazioni di biologia e di medicina;
- riconoscendo il fatto che i dati personali devono essere adeguatamente protetti in conformità con i principi di protezione dei dati stabiliti nella Convenzione per la Protezione delle Persone riguardo al Trattamento Automatizzato dei Dati Personali (ETS No. 108);
- prendendo in considerazione gli standard professionali nazionali e internazionali nell'area della ricerca clinica e il precedente lavoro, condotto in questo campo, dal Comitato dei Ministri e dall'Assemblea Parlamentare del Consiglio di Europa;
- riconoscendo il valore della ricerca biomedica per il progresso dell'assistenza sanitaria e per il miglioramento della qualità della vita e il potenziale delle raccolte di materiali biologici di origine umana per facilitare la realizzazione di questi benefici;
- sottolineando che la ricerca è spesso transdisciplinare e internazionale, e questo si riflette nella creazione di infrastrutture di ricerca internazionali che raccolgono e condividono

Questo articolo è la traduzione di Recommendation CM/Rec (2016)6 of the Committee of Ministers to members states on research on biological materials of human origin. La versione originale è disponibile come materiale supplementare (1S).

Ricevuto: 11.05.2021

Accettato: 08.06.2021

Pubblicato on-line: 06.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.051

campioni e dati oltre i confini nazionali, e sottolineando l'importanza dell'interoperabilità in questo contesto;

- prendendo in considerazione lo sviluppo, attuale e programmato a livello nazionale, delle raccolte di materiali biologici di origine umana e dell'esistenza di collezioni allestite a fini clinici;
 - ricordando che la ricerca biomedica condotta su materiali biologici dovrebbe essere liberamente esercitata in ottemperanza alle disposizioni di questa raccomandazione e di altre disposizioni giuridiche che assicurano la protezione dell'individuo;
 - sottolineando che l'interesse fondamentale dovrebbe essere la tutela dell'essere umano, i cui materiali biologici sono acquisiti, conservati o usati per ricerca;
 - sottolineando che l'interesse e il benessere della persona, i cui materiali biologici sono usati per ricerca, deve prevalere sul solo interesse della società o della scienza;
 - affermando che particolare tutela deve essere garantita alle persone vulnerabili nel contesto della ricerca, in particolare a coloro che non sono in grado di prestare il loro consenso;
 - considerando che i nuovi sviluppi nel campo della ricerca biomedica, in particolare nel campo della genetica, aumentano le questioni riguardanti la tutela della privacy;
 - riconoscendo che ognuno ha il diritto di accettare o di rifiutare la partecipazione alla ricerca biomedica senza nessuna costrizione o obbligo;
 - enfatizzando l'importanza di ottenere fiducia e sottolineando il ruolo di una trasparente e adeguata gestione dei materiali biologici di origine umana conservati a fini di ricerca, compresa l'istituzione di un'adeguata politica di gestione;
 - ricordando che ai ricercatori dovrebbe essere consentito un equo accesso alle collezioni sviluppate grazie a donazioni di materiali biologici di origine umana effettuate con spirito di solidarietà;
 - decidendo di intraprendere, nel campo della ricerca biomedica condotta su materiale di origine umana, le misure atte a garantire la dignità dell'essere umano e i Diritti e le Libertà Fondamentali della persona.
1. raccomanda ai governi degli Stati membri:
 - a. di adattare le loro leggi e procedure per garantire l'attuazione, compresi gli eventuali aggiornamenti, alle linee guida contenute nell'appendice di questa raccomandazione, successiva alla Raccomandazione Rec(2006)4;
 - b. di promuovere la definizione di codici di buona pratica per garantire il rispetto delle linee guida contenute in questa appendice;
 2. incarica il Segretario Generale del Consiglio d'Europa di trasmettere questa raccomandazione ai Governi degli Stati non-Membri del Consiglio d'Europa, invitati a firmare la Convenzione sui Diritti Umani e la Biomedicina, all'Unione Europea e ad altre rilevanti organizzazioni internazionali governative e non governative.

APPENDICE ALLA RACCOMANDAZIONE

LINEE GUIDA

Capitolo I - Oggetto e scopo

Art. 1 - Oggetto

Gli Stati Membri dovrebbero proteggere la dignità e l'identità di tutti gli esseri umani e garantire ad ognuno, senza discriminazione, il rispetto della propria integrità, il diritto al rispetto della vita privata, nonché gli altri diritti e libertà fondamentali, nell'ambito di qualsiasi attività di ricerca che rientri nella regolamentazione della presente raccomandazione.

Art. 2 - Scopo

1. Questa raccomandazione si applica alle seguenti attività di ricerca:
 - acquisizione di materiali biologici di origine umana destinati alla conservazione per futuri scopi di ricerca;
 - conservazione di materiali biologici di origine umana per futuri scopi di ricerca;
 - utilizzo, in un progetto di ricerca, di materiali biologici di origine umana conservati o precedentemente ottenuti per un altro scopo, compreso un precedente progetto di ricerca.
2. Questa raccomandazione non si applica a:
 - materiali biologici embrionali e fetali;
 - utilizzo in un progetto di ricerca specifico di materiali biologici di origine umana acquisiti ai soli fini di quel progetto. Ciò rientra nell'ambito del Protocollo Aggiuntivo sulla Ricerca Biomedica (CETS No. 195).
3. Quando acquisiti, conservati o utilizzati, i materiali biologici di origine umana possono essere accompagnati dai dati personali associati. Laddove nella presente raccomandazione le disposizioni facciano riferimento a materiali biologici di origine umana, queste si estendono, se rilevanti, anche ai dati personali associati.

Art. 3 - Identificabilità dei materiali biologici

1. I materiali biologici cui fa riferimento l'art. 2 possono essere identificabili o non identificabili:
 - i. "materiali biologici identificabili" sono quei materiali che, da soli o in combinazione con i dati, consentono l'identificazione delle persone da cui sono stati prelevati i materiali biologici, direttamente o attraverso l'uso di codice/i. Nei casi in cui l'identificazione sia possibile tramite codice/i, l'utilizzatore del materiale biologico può avere accesso diretto al/i codice/i o, in alternativa, il/i codice/i può/possono essere sotto il controllo di una parte terza.
 - ii. "materiali biologici non identificabili" sono quei materiali che, da soli o in combinazione con i dati, non consentono, con ragionevole sforzo, di identificare la persona da cui sono stati prelevati i materiali biologici.

2. La non identificabilità dovrebbe essere verificata mediante un'adeguata procedura di revisione.

Capitolo II - Disposizioni generali

Art. 4 - Rischi e benefici in relazione alle attività di ricerca

1. I rischi fisici derivanti dall'acquisizione di materiali biologici ai fini della conservazione e della ricerca futura, dovrebbero essere minimizzati.
2. I rischi per le persone da cui sono stati prelevati i materiali biologici e, quando appropriato anche per le loro famiglie, in relazione alle attività di ricerca, e in particolare i rischi per la loro vita privata, dovrebbero essere resi minimi, tenendo conto della natura delle attività di ricerca. Inoltre, tali rischi non dovrebbero essere sproporzionati rispetto ai potenziali benefici dell'attività di ricerca.
3. In questo contesto dovrebbero essere considerati anche i possibili rischi per gli individui appartenenti allo stesso gruppo di persone da cui sono stati prelevati i materiali biologici.

Art. 5 - Non discriminazione

1. Nell'intero ambito delle attività di ricerca, dovrebbero essere attuate tutte le necessarie misure atte a prevenire la discriminazione e a minimizzare la probabilità di emarginazione di qualsiasi persona, famiglia o gruppo.
2. Il rifiuto di prestare il consenso o l'autorizzazione per l'acquisizione, la conservazione o l'uso di materiali biologici ai fini di ricerca o il ritiro del consenso o modifiche dello scopo del consenso o dell'autorizzazione, non dovrebbero comportare alcuna forma di discriminazione nei confronti della persona coinvolta, in particolare per quanto riguarda il diritto all'assistenza medica.

Art. 6 - Divieto di profitto

I materiali biologici di origine umana non dovrebbero, come tali, consentire un guadagno economico.

Art. 7 - Riservatezza

1. Qualsiasi informazione di natura personale raccolta al momento dell'acquisizione, conservazione o utilizzo di materiali biologici, o ottenuta tramite ricerca, dovrebbe essere considerata riservata e trattata secondo le norme relative alla tutela della vita privata.
2. Dovrebbero essere messe in atto adeguate misure di sicurezza per garantire la riservatezza al momento dell'acquisizione, della conservazione, dell'uso e, dove appropriato, del trasferimento dei materiali biologici.

Art. 8 - Informazioni pubbliche

Gli Stati membri dovrebbero adottare misure adeguate per facilitare l'accesso del pubblico alle informazioni generali sulla natura e sull'obiettivo delle raccolte a scopo di ricerca e sulle condizioni relative all'acquisizione, alla conservazione e all'uso di materiali biologici a fini di ricerca, compresi gli aspetti relativi al consenso o all'autorizzazione.

Art. 9 - Protezione più estesa

Nessuna delle disposizioni di questa raccomandazione dovrebbe essere interpretata come limitante o pregiudiziale alla facoltà di ciascun Paese Membro di garantire una tutela più ampia di quella prevista nella presente raccomandazione.

Capitolo III - Acquisizione e conservazione per le ricerche future

Art. 10 - Informazioni

1. Prima del consenso o dell'autorizzazione alla conservazione di materiali biologici per ricerche future, alla persona coinvolta dovrebbero essere fornite informazioni comprensibili e quanto più possibile precise per quanto riguarda:
 - la natura dell'uso previsto per la ricerca e le possibili scelte a tale riguardo;
 - le condizioni applicabili alla conservazione dei materiali, comprese le politiche di accesso ed eventuali trasferimenti;
 - eventuali condizioni pertinenti che regolano l'uso dei materiali, incluso il ricontatto e il riscontro.
2. Dovrebbero essere fornite informazioni riguardanti i diritti e le garanzie previste dalla legge, e in particolare il diritto di rifiutare il consenso o l'autorizzazione e di revocare il consenso o l'autorizzazione in qualsiasi momento, ai sensi dell'articolo 13. Questa informazione dovrebbe anche includere ogni possibile limitazione alla revoca del consenso o dell'autorizzazione.
3. Prima dell'acquisizione di materiali biologici per la conservazione per ricerche future, dovrebbero essere fornite informazioni aggiuntive specifiche delle modalità di acquisizione/prelievo dei materiali.
4. Le persone che, secondo la legge, non sono in grado di prestare il consenso dovrebbero essere informate in modo adeguato rispetto alla loro capacità di comprensione.

Art. 11 - Materiali biologici di persone in grado di prestare il consenso

1. I materiali biologici dovrebbero essere acquisiti per la conservazione ai fini di ricerche future, solo con il consenso preventivo, libero, espresso e documentato della persona interessata. Tale consenso deve essere:

- i. specifico circa l'intervento da eseguire per l'acquisizione dei materiali;
 - ii. quanto più possibile preciso sull'uso previsto per la ricerca.
2. I materiali biologici acquisiti precedentemente per un altro scopo dovrebbero essere conservati per ricerche future solo con un appropriato consenso, come previsto dalla legge. Quando possibile, il consenso dovrebbe essere richiesto prima di acquisire i materiali biologici.
 3. I materiali biologici precedentemente acquisiti per altro scopo e già non identificabili, possono essere conservati per future ricerche previa autorizzazione prevista dalla legge.

Art. 12 - Materiali biologici da persone non in grado di fornire il consenso

1. I materiali biologici di una persona che, secondo la legge, non è in grado di fornire il consenso, dovrebbero essere ottenuti o conservati solo per ricerche future che hanno il potenziale di produrre, in assenza di un vantaggio diretto alla persona stessa, vantaggi ad altre persone nella stessa fascia di età o affetti dalla stessa malattia o disturbo o aventi la stessa condizione, o qualora gli scopi della ricerca non possano ragionevolmente essere raggiunti utilizzando materiali biologici di persone in grado di fornire il consenso.
2. I materiali biologici dovrebbero essere acquisiti per la conservazione ai fini di ricerche future da una persona non in grado di prestare consenso solo alle seguenti condizioni:
 - a. l'acquisizione comporta solo un rischio minimo; e
 - b. l'autorizzazione scritta per tale acquisizione è stata concessa dal rappresentante o da un'autorità, persona od organismo previsto dalla legge.
 L'autorizzazione necessaria dovrebbe essere:
 - i. specifica, circa le modalità di acquisizione dei materiali;
 - ii. quanto più possibile precisa sull'uso previsto per la ricerca.
3. I materiali biologici precedentemente acquisiti, per un altro scopo, da una persona non in grado di fornire il consenso, dovrebbero essere conservati solo per ricerche future con l'autorizzazione del suo rappresentante o di un'autorità, persona od organismo previsto dalla legge. Quando possibile, l'autorizzazione dovrebbe essere richiesta prima di acquisire i materiali biologici.
4. Se la persona che non è in grado di fornire il consenso è una persona adulta, dovrebbe, per quanto possibile, partecipare alla procedura di autorizzazione. Se la persona che non è in grado di prestare il consenso è un minore, la sua opinione dovrebbe essere presa in considerazione come fattore determinante in relazione all'età e al grado di maturità. Ogni obiezione da parte della persona che non è in grado di fornire il consenso dovrebbe essere

rispettata. Eventuali volontà precedentemente espresse da tale persona dovrebbero essere prese in considerazione.

5. Qualora una persona non in grado di dare il consenso, i cui materiali biologici siano stati conservati per ricerche future, ottenga o riacquisti la capacità di fornire il consenso, dovrebbero essere compiuti ragionevoli sforzi per ottenere il consenso di tale persona per continuare la conservazione e l'uso dei suoi materiali biologici a scopi di ricerca.
6. I materiali biologici precedentemente acquisiti, per un altro scopo, da una persona non in grado di fornire il consenso e che sono già non identificabili possono essere conservati per future ricerche previa autorizzazione prevista dalla legge.

Art. 13 - Diritto di revocare il consenso o l'autorizzazione

1. Una persona che abbia fornito il consenso alla conservazione di un campione biologico identificabile, a scopo di ricerca, dovrebbe poter conservare il diritto di ritirare il consenso in qualsiasi momento, e, ove possibile, di modificare lo scopo di tale consenso, senza essere soggetta ad alcuna forma di discriminazione, in particolare per quanto riguarda il diritto all'assistenza medica. Nel caso in cui i campioni identificabili siano conservati esclusivamente a scopo di ricerca, la persona che ha ritirato il consenso dovrebbe avere il diritto di far distruggere o rendere non-identificabili senza tracciabilità i propri campioni e i dati associati, secondo le modalità previste dalle leggi nazionali. La persona che sta valutando la revoca del consenso dovrebbe essere informata su eventuali limitazioni riguardanti il ritiro dei propri materiali biologici.
2. Il rappresentante, l'autorità, la persona o l'organo di legge che ha dato l'autorizzazione per la conservazione per ricerca futura di materiali biologici identificabili prelevati da una persona che, secondo la legge, non ha la capacità di dare il consenso, dovrebbe avere gli stessi diritti esposti nel paragrafo 1, senza alcuna forma di discriminazione per la persona dalla quale il materiale è stato acquisito, in particolare per quanto riguarda il diritto all'assistenza medica. Se la persona da cui sono stati acquisiti i materiali biologici ottiene o riacquista la capacità di fornire il consenso, tale persona dovrebbe avere i diritti esposti al paragrafo 1.

Art. 14 - Campioni biologici prelevati dopo la morte

1. Il prelievo di campioni biologici dal corpo di una persona deceduta, per la conservazione a scopi di ricerca futura, dovrebbe essere possibile solo con un appropriato consenso o autorizzazione come previsto dalla legge. Tale consenso o autorizzazione dovrebbe essere preceduto da un'adeguata informazione, compreso il diritto di rifiuto.

2. Non dovrebbero essere prelevati per la conservazione per ricerca futura, materiali biologici da una persona deceduta qualora questa avesse espresso parere contrario in precedenza.

Capitolo IV - Governance delle collezioni

Art. 15 - Regola generale

I materiali biologici destinati ad essere utilizzati per la ricerca futura dovrebbero essere conservati solo in modo strutturato e in conformità ai principi di governance stabiliti in questo capitolo.

Art. 16 - Principi di governance

1. Dovrebbe essere designata la persona/organizzazione responsabile della raccolta dei campioni biologici e questa informazione dovrebbe essere disponibile al pubblico.
2. Lo/gli scopi/i della raccolta dovrebbero essere specificati. Trasparenza e tracciabilità dovrebbero essere i principi su cui si fonda la gestione, comprendendo, se appropriato, accesso, uso, trasferimento dei campioni e rivelazione di informazioni.
3. Qualsiasi cambiamento dello scopo di una collezione dovrebbe essere soggetto ad un esame da una fonte indipendente sulla sua conformità rispetto alle disposizioni della presente raccomandazione e, se necessario, si dovrebbe richiedere uno specifico consenso o autorizzazione delle persone coinvolte.
4. Ogni campione di materiale biologico facente parte della collezione, dovrebbe essere documentato e rintracciabile in modo appropriato, includendo le informazioni sullo scopo per il quale è stato fornito il consenso o l'autorizzazione.
5. Dovrebbe essere attivato un sistema di qualità che comprenda le condizioni per garantire adeguata sicurezza e riservatezza durante la raccolta, la conservazione, l'uso e, se appropriato, il trasferimento dei materiali biologici.
6. Dovrebbero essere stabilite procedure per qualsiasi trasferimento della totalità o di parte delle collezioni, nonché per la chiusura della collezione. Tali procedure dovrebbero essere conformi al consenso o all'autorizzazione originale.
7. Le informazioni sulla gestione e sull'uso delle collezioni dovrebbero essere messe a disposizione delle persone coinvolte e dovrebbero essere regolarmente aggiornate, al fine di facilitare, se appropriato, l'esercizio dei diritti esposti nell'articolo 13.
8. I rapporti sulle attività passate e pianificate dovrebbero essere resi pubblici almeno una volta l'anno, comprese le informazioni sull'accesso consentito ai materiali biologici e sui progressi nei progetti di ricerca che utilizzano materiali biologici. Una sintesi dei risultati dovrebbe essere resa pubblica al completamento di ogni progetto di ricerca.

Art. 17 - Riscontri

1. Dovrebbero essere messe in atto politiche chiare sulle modalità per fornire alle persone cui appartengono i materiali biologici, riscontri/informazioni relative a i risultati rilevanti per la salute e che derivano dall'uso dei loro materiali biologici, comprese le persone che, secondo la legge, non sono in grado di dare il consenso.
2. Laddove fornito, il riscontro/informazione dovrebbe avvenire in un quadro di adeguata assistenza sanitaria o consulenza.
3. È necessario rispettare la scelta di coloro che non vogliono essere informati su risultati rilevanti per la loro salute.

Art. 18 - Accesso

1. Gli Stati membri dovrebbero adottare misure per facilitare un accesso appropriato alle raccolte di materiali biologici, da parte dei ricercatori.
2. Dovrebbero essere stabilite e documentate chiaramente le condizioni che disciplinano l'accesso e l'uso di materiali biologici, compreso il rispetto di eventuali restrizioni definite dalle persone interessate.
3. Dovrebbero essere sviluppate e pubblicate politiche di accesso trasparenti, comprese le disposizioni per la supervisione delle procedure di accesso e trasferimento.
4. Dovrebbero essere sviluppati meccanismi di accesso appropriati per massimizzare il valore delle collezioni. Questi dovrebbero includere la tracciabilità dell'uso dei materiali biologici ai quali è stato consentito l'accesso.

Art. 19 - Scambi Internazionali

1. I materiali biologici dovrebbero essere trasferiti in un altro Stato solo se è garantito un livello adeguato di protezione dalla legge di quello Stato o da strumenti giuridicamente vincolanti e applicabili, adottati e attuati dalle parti coinvolte nel trasferimento.
2. Il trasferimento di materiali biologici dovrebbe essere effettuato in condizioni di adeguata sicurezza e riservatezza.
3. Dovrebbe essere firmato un accordo documentato tra il mittente del materiale biologico e il destinatario. L'accordo dovrebbe includere un appropriato consenso o autorizzazione, e, se necessario, qualsiasi restrizione definita dalla persona coinvolta.

Art. 20 - Controllo

1. Qualsiasi proposta per effettuare una raccolta di materiali biologici dovrebbe essere soggetta ad una valutazione da fonte indipendente relativamente alla sua conformità rispetto alle disposizioni della presente raccomandazione.
2. Ogni raccolta dovrebbe essere soggetta a un controllo da fonte indipendente proporzionato ai

rischi per le persone i cui materiali biologici sono conservati nella raccolta. Tale controllo dovrebbe mirare in particolare a salvaguardare i diritti e gli interessi delle persone coinvolte nel contesto delle attività di raccolta.

- a. I meccanismi di sorveglianza dovrebbero prevedere, come minimo:
 - i. l'attuazione di misure di sicurezza e di procedure sull'accesso e l'uso di materiali biologici;
 - ii. la pubblicazione, almeno una volta all'anno, di rapporti sulle attività passate e programmate, comprese le informazioni sull'accesso consentito ai materiali biologici e sui progressi della ricerca che utilizza materiali biologici;
 - iii. la variazione dei rischi per le persone i cui materiali biologici sono conservati nella raccolta e, se appropriato, la revisione delle politiche;
 - iv. la fornitura di adeguate informazioni, alle persone coinvolte, sui cambiamenti nella gestione della raccolta perchè possano, se appropriato, esercitare i diritti stabiliti nell'articolo 13;
 - v. lo sviluppo e l'implementazione di politiche di riscontro, inclusa la revisione periodica.
- b. I meccanismi di controllo dovrebbero essere in grado di adattarsi alle possibili evoluzioni della raccolta e della sua gestione.

Capitolo V - Uso di materiali biologici in un progetto di ricerca

Art. 21 - Regola generale

1. I materiali biologici dovrebbero essere utilizzati in un progetto di ricerca solo se quest'ultimo rientra negli scopi dichiarati nel consenso informato rilasciato dalla persona coinvolta.
2. a. Qualora in un progetto di ricerca, l'uso proposto per un campione biologico identificabile non rientri nello scopo del precedente consenso o autorizzazione rilasciati dalla persona interessata, dovrebbe essere richiesto il consenso o autorizzazione per il nuovo uso proposto e, al fine di ottenere il consenso, dovrebbe essere fatto un ragionevole sforzo per contattare la persona interessata. Va rispettato il desiderio dell'interessato di non essere contattato.
- b. Se il tentativo di contattare la persona interessata non andasse a buon fine, i suoi campioni biologici potranno essere impiegati nel progetto di ricerca, solamente dopo che sia stata fatta una valutazione indipendente dell'ottemperanza delle seguenti condizioni:
 - i. evidenze che sono stati compiuti sforzi ragionevoli per contattare la persona interessata;

- ii. rilevanza del quesito scientifico e conformità al principio di proporzionalità;
 - iii. evidenze che gli scopi della ricerca non possono essere ragionevolmente perseguiti usando campioni di soggetti dei quali possa essere ottenuto il consenso o autorizzazione;
 - iv. mancanza di prove che la persona interessata si sia espressamente opposta a un tale uso.
3. Qualsiasi uso di materiali biologici in una forma identificabile dovrebbe essere giustificato anticipatamente nel protocollo di ricerca.
 4. I materiali biologici non identificabili possono essere utilizzati in un progetto di ricerca a condizione che tale uso non violi alcuna restrizione definita dall'interessato prima che i materiali siano stati resi non identificabili e soggetti all'autorizzazione prevista dalla legge.
 5. I materiali biologici provenienti da persone che, secondo la legge, non sono in grado di fornire il consenso dovrebbero essere utilizzati solo per ricerche che hanno il potenziale di produrre, in assenza di beneficio diretto per la persona interessata, benefici per altre persone della stessa fascia di età o affetti dalla stessa malattia o disturbo o che hanno la stessa condizione e se gli obiettivi della ricerca non possono essere ragionevolmente raggiunti utilizzando materiali biologici di persone in grado di fornire il consenso.

Art. 22 - Revisione da fonte indipendente

1. La ricerca dovrebbe essere realizzata solo se il progetto è stato sottoposto ad una revisione condotta da fonte indipendente, in merito al contenuto scientifico, comprendente anche la valutazione della rilevanza dello scopo della ricerca e della verifica della sua accettabilità. La normativa può richiedere un'ulteriore approvazione da parte di un organo competente.
2. Nell'esaminare la ricerca, gli Stati Membri dovrebbero applicare le disposizioni relative ai Comitati Etici contenute nel capitolo III del "Additional protocol concerning biomedical research" (CETS N° 195), all'interno dello scopo di questa raccomandazione.
3. Le procedure di revisione possono essere adattate alla natura della ricerca e a quanto le persone da cui sono stati prelevati i materiali biologici possono essere identificate in base ai loro campioni biologici.

Art. 23 - Disponibilità dei risultati

1. Al termine della ricerca, dovrebbe essere presentato un rapporto o una sintesi al comitato etico o all'organo competente e, se applicabile, alla persona e/o istituzione responsabile della raccolta che ha consentito l'accesso ai materiali biologici.
2. Il ricercatore dovrebbe adottare misure appropriate per rendere pubblici i risultati della ricerca in tempi ragionevoli.

Capitolo VI - Riesame della raccomandazione*Art. 24 - Riesame della raccomandazione*

La presente raccomandazione dovrebbe essere riesaminata regolarmente dopo la sua adozione, con particolare attenzione ai nuovi sviluppi nel settore e all'esperienza acquisita nell'implementazione delle sue linee guida.

Principi per l'implementazione e la gestione del point-of-care-testing (POCT): indicazioni essenziali

Erica Rampoldi¹, Giovanna Patrucco², Marco Casati³, Benedetto Morelli⁴, Paolo Carraro⁵ per il Gruppo di Studio Point of Care Testing (POCT)

¹ASST OVEST MILANESE, Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Ospedale di Legnano

²Direttivo SIBioC Piemonte, Gruppo di Studio POCT

³ASST Monza, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale San Gerardo

⁴Synlab, Castenedolo, Brescia

⁵AULSS3-Veneto, Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio

ABSTRACT

Implementation and management of the point-of-care testing (POCT): essential indications.

In recent years, the field of medicine has considerably changed; an important, widespread trend is the reorganization of medical laboratories. These facilities made an effort to improve their efficiency through a process of consolidation and decentralization. In this context, Point-of-Care Testing (POCT) devices offer numerous advantages, but also pose a clinical risk, particularly in Italy, which is limited by its varied, often inadequate, regional regulations. Some examples are reported, representing scenarios of frequent or bothersome POCT use. This document outlines the SIBioC Working Group recommendations for the safe use of POCT instruments. It defines how these have been updated to the state of technologies and medical requirements. Particular attention has been paid to clinical governance, connectivity, the role of the laboratory director and staff, quality control, education, risk management and the role of the *in vitro* diagnostic companies. Most of the Italian medical practice is based on hospital experience, but the recent pandemic outbreak of SARS-CoV-2 forces us to re-think about the use of POCT in settings that are outside of the hospital such as local clinics, nursing homes and primary care facilities. These facilities will be the next important field of application for those indispensable tools. Networks of instruments, professionals and competence should be carefully tailored to meet local needs and specific clinical settings.

Parole chiave: raccomandazioni, near-patient-testing, medicina territoriale

PREMESSA

Nel 2011 è stato pubblicato su *Biochimica Clinica* un contributo del Gruppo di Studio (GdS) Point of Care Testing (POCT) "Raccomandazioni per l'implementazione e la gestione del POCT" (1). Il documento ha dato origine ad un proficuo confronto su questo tema, promuovendo scambi di idee e di esperienze. A distanza di dieci anni, i rapidi cambiamenti della tecnologia e le nuove necessità della Medicina, rendono indispensabile un

aggiornamento. Questo nuovo Documento fornisce in particolare indicazioni attuali, su Connettività, Formazione, Gestione del Rischio Clinico, che sono aspetti essenziali per un approccio globale alla gestione della rete dei POCT. Queste indicazioni riflettono l'influsso della tradizionale "Governance"* ospedaliera dei POCT che rappresenta, ad oggi la quasi totalità dell'esperienza italiana documentata.

Buona parte delle indicazioni riportate sono applicabili a svariati contesti sanitari dove occorrono

*Si è utilizzato il termine "Governance" e non "Gouvernement" in quanto il secondo termine è più rivolto ad aspetti di gerarchia ed amministrazione, mentre "governance" include il concetto di partecipazione attiva indispensabile alla gestione dei POCT. Il termine Inglese è stato preferito al termine italiano "governo clinico" poiché il termine anglosassone è più significativo e di uso internazionale.

Corrispondenza a: Erica Rampoldi, Coordinatrice del Gruppo di studio POCT, Delegato Regionale per la Regione Lombardia.
Tel 0039-348-3942360, E-mail erampoldi@gmail.com

Ricevuto: 02.04.2021

Revisionato: 14.04.2021

Accettato: 19.04.2021

Pubblicato on-line: 07.05.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.032

risultati immediati; questi nuovi contesti saranno la grande area di espansione dei POCT. Sempre più ambiti di diagnostica di laboratorio sono gestiti con questa tecnologia; entrare nel merito di tutti è impossibile, saranno illustrati alcuni esempi particolarmente attuali, lasciando agli esperti di settore ogni ulteriore aggiornamento specifico. L'attuale crisi pandemica da SARS-CoV-2 rende ancor più necessaria una riflessione sull'utilizzo di sistemi POCT in ambito territoriale.

INTRODUZIONE

La crescente necessità di ottenere informazioni diagnostiche precoci e rapide, assieme al monitoraggio continuo dello stato di salute del paziente in diversi ambiti di cura (case della salute, cure a domicilio, ospedali di comunità, ambulatori medici, mezzi di trasporto sanitario, dipartimenti di urgenza emergenza, reparti ospedalieri, terapie intensive, farmacie, siti di screening pubblici) impone lo sviluppo di tecnologie diagnostiche, che possano supportare tale esigenza al di fuori del laboratorio e vicino al sito di cura del paziente. In tal senso il POCT rappresenta una tecnologia consolidata ed in continuo e rapido sviluppo con importanti prospettive. Il mercato della diagnostica prevede infatti una cospicua e continua crescita dei sistemi POCT nei prossimi anni, come evidenziato da differenti agenzie internazionali di ricerche di mercato (2-4). Infine, tecnologie emergenti stanno determinando una nuova accelerazione nel monitoraggio dei parametri vitali biochimici al punto da discutere di "next-generation POCT devices" come descritto in recenti pubblicazioni (5-6). Al rapido sviluppo tecnologico non ha corrisposto un adeguato e coerente processo di regolamentazione sull'utilizzo dei sistemi POCT, anche se sono state pubblicate Raccomandazioni e Linee Guida a livello nazionale (6,7), europeo (8-12), internazionale (13-18) ed è stata emanata la norma ISO 22870 specifica per l'ambito del POCT (19). Tale norma è destinata, in un prossimo futuro, a fondersi con la ISO 15189 (20), così da disporre di un'unica direttiva compatta e congruente. In ambito italiano, i riferimenti normativi sul POCT sono molto variegati e spesso conseguenti alla eterogeneità dei Servizi Sanitari Regionali, come è stato evidenziato recentemente (21).

SCOPO DEL DOCUMENTO

Nel Documento vengono definiti i principi per l'implementazione di una gestione dei POCT che possa assicurare risultati affidabili e promuovere una armonizzata gestione fra i diversi contesti. In particolare, sono stati approfonditi i seguenti ambiti:

- fornire una guida pratica all'implementazione dei sistemi POCT con garanzia di una diagnostica tempestiva che garantisca sicurezza e qualità;
- indicare un modello gestionale organizzativo integrato per supportare non solo i professionisti di laboratorio, ma anche altre figure coinvolte nell'utilizzo dei POCT;

- informare e formare gli utilizzatori sugli aspetti più recenti relativi agli avanzamenti tecnologici in continua evoluzione.

L'implementazione dei sistemi presenta aspetti differenti, in base alle varie situazioni d'uso e al personale che esegue l'esame; i POCT si prestano ad utilizzazioni sia in campo strettamente clinico (ospedali, ambulatori, centri medici polispecialistici, laboratori finalizzati ad esami specialistici), sia in ambiti dove vi sia richiesta di diagnostica delocalizzata, quali: domicilio dei pazienti, case della salute e farmacie centri di riabilitazione, centri sportivi, servizi di pubblica utilità (screening di popolazione).

Le raccomandazioni riportate forniscono indicazioni essenziali e pratiche da utilizzare nell'ambito delle organizzazioni ospedaliere. Ciononostante dovrebbero essere fortemente prese in considerazione per strutturare la governance dei POCT dislocati in ambito extra-ospedaliero. Non si applicano ai sistemi di registrazione quali, ad esempio, saturimetri in continuo e sensori per monitoraggio costante della glicemia.

SPECIFICHE PER LA GESTIONE DEI POCT

A causa delle potenziali gravi conseguenze derivanti dall'uso di risultati inaffidabili degli esami di laboratorio, è fondamentale definire alcune specifiche essenziali che assicurino il controllo dell'intero processo d'esame e il rilascio di risultati di alta qualità (18).

Selezione dei dispositivi POCT

Per una scelta adeguata del sistema occorre:

- definire gli obiettivi clinico-assistenziali che ci si prefigge di raggiungere: diagnosi, screening, monitoraggio, tempo di risposta (TAT) richiesto, prestazioni analitiche, necessità di stoccaggio del materiale in magazzino refrigerato o a temperatura ambiente, smaltimento rifiuti;
- stabilire le necessità di personale e conoscerne il grado di formazione;
- effettuare una verifica della strumentazione eventualmente già esistente e mapparne la distribuzione, componendo una tabella con localizzazione e pannello degli analiti eseguiti da ogni strumento;
- effettuare una verifica della rete informatica e dei software gestionali esistenti;
- effettuare (insieme ai Servizi di Ingegneria clinica, ove presenti) una verifica delle necessità di installazione (sistema elettrico, connettività, e così via);
- quantificare il possibile carico di lavoro;
- stimare l'impatto economico.

Responsabilità

L'uso appropriato dei POCT deve essere considerato da una prospettiva di governance e deve prevedere valutazioni in termini di efficacia clinica, programmi di

gestione del rischio e di formazione continua degli operatori e processi di audit. Il Laboratorio dovrebbe avere la piena responsabilità del POCT al fine di garantire una governance che assicuri l'affidabilità dei risultati, nello spazio e nel tempo. La costituzione di un comitato multidisciplinare locale facilita la progettazione e la pianificazione di tutte le attività, facendo emergere le necessità dei vari gruppi e raccogliendo proposte, indicazioni correttive e possibili soluzioni. Poiché i contesti operativi e le diverse realtà delle organizzazioni sanitarie non permettono di definire un singolo modello, di seguito è proposta una guida adattabile alle specifiche realtà.

Composizione del Comitato multidisciplinare

Il Comitato Multidisciplinare dovrebbe includere:

- direttore del laboratorio (o suo delegato);
- dirigente di laboratorio (coordinatore POCT con funzioni di POCT Manager di laboratorio);
- direttore sanitario (o suo delegato);
- direttore di farmacia (o suo delegato);
- tecnico di laboratorio (coordinatore POCT);
- consulente infermiere;
- consulente clinico referente di Unità Operativa;
- responsabile servizio di ingegneria clinica (o suo delegato);
- responsabile dei sistemi informativi (o suo delegato)
- rappresentante dell'ufficio tecnico per gli aspetti impiantistici

Attività del Comitato multidisciplinare

Le attività a cui è chiamato il comitato dovrebbero:

- stabilire l'appropriatezza dell'utilizzo del POCT nel contesto richiesto;
- stabilire che l'utilizzo del POCT non sia vicariante di carenze organizzative;
- individuare i clinici, gli infermieri referenti, i tecnici di laboratorio e il personale autorizzato all'esecuzione delle analisi per ogni sito del POCT;
- definire le procedure per l'acquisizione delle tecnologie;
- definire le procedure per la connessione telematica dei POCT al laboratorio di riferimento;
- istituire un registro dei sistemi POCT acquisiti;
- eseguire la mappatura delle localizzazioni degli strumenti in uso;
- stabilire i criteri e le procedure per gestire il rischio;
- garantire il rispetto dei requisiti normativi.

I contesti in cui i POCT sono collocati, possono essere molto diversi fra loro; è pertanto impossibile proporre un unico modello di gestione. Il ruolo del Comitato multidisciplinare è fondamentale nell'effettuare una scrupolosa valutazione della realtà locale ed operare la giusta scelta per la gestione dei POCT, al fine di rendere efficace il loro uso. Florkowski et al. (22) presentano una tabella riassuntiva con relativa trattazione che ben evidenziano le aree in cui è stata indagata l'utilità dei POCT.

Le analisi in POCT devono essere eseguite sotto la responsabilità del Direttore del Servizio di Medicina di Laboratorio, che dovrebbe definire le modalità d'uso, le procedure per la verifica di qualità e la formazione degli operatori (23). Le figure coinvolte per la gestione sono:

- direttore del Servizio di Medicina di Laboratorio;
- POCT Manager in Laboratorio;
- coordinatore POCT in laboratorio;
- POCT Manager nelle strutture delocalizzate;
- operatori abilitati all'utilizzo
- ingegneria clinica

Devono essere a disposizione degli operatori, i riferimenti di tutte le persone interessate alla gestione dei POCT come proposto, a titolo di esempio, nella Tabella 1.

Alcune attività specifiche

Direttore del Servizio di Medicina di Laboratorio:

- è garante della politica e degli obiettivi del sistema di gestione della qualità per i POCT;
- è garante dell'applicazione delle norme di sicurezza;
- definisce i criteri per la scelta dei sistemi POCT e gli esami relativi;
- predispone i capitoli;
- nomina il POCT Manager (dirigente del Laboratorio).

POCT Manager in laboratorio:

- collabora alla stesura dei capitoli ed alla scelta dei sistemi;
- organizza la formazione;
- definisce le specifiche per garantire la tracciabilità degli operatori (ad esempio scelta della tipologia di "identificativo" per gli operatori);
- definisce le specifiche per garantire la tracciabilità dei risultati;
- nomina, di concerto col Direttore del Servizio di Medicina di Laboratorio, i referenti tecnici ed infermieristici;
- pianifica le procedure per la gestione del CQI (frequenza e tipologia) e la partecipazione ai Programmi di VEQ;
- verifica i risultati del CQI e della VEQ;
- predispone ed aggiorna i documenti per la gestione POCT (ad esempio istruzioni operative, procedure, mappe degli strumenti, elenco reparti, referenti, ecc.);
- definisce le modalità di segnalazione di incidenti avversi e delle (NC);
- stabilisce efficaci relazioni interpersonali.

Coordinatore Tecnico di laboratorio. La presenza periodica di personale di Laboratorio nelle sedi dove sistemi POCT sono installati (strutture delocalizzate), trasmette a chi esegue le analisi maggior sicurezza operativa e mantiene un rapporto continuativo con la Medicina di Laboratorio.

Il Coordinatore tecnico:

- opera in stretta collaborazione con il POCT Manager

Tabella 1

Esempio di scheda contenente i nominativi e contatti del personale di riferimento per i POCT

| REPARTO OSPEDALIERO | | | | | | |
|---------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|--------|-------------------------------------|
| NOME | QUALIFICA | MATRICOLA | Tel. LAVORO | CELLULARE | E-MAIL | SOCIAL ACCOUNT twitter/instagram |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| CASA DI CURA | | | | | | |
| NOME | QUALIFICA | MATRICOLA | Tel. LAVORO | CELLULARE | E-MAIL | SOCIAL ACCOUNT twitter/instagram |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| TERRITORIO | | | | | | |
| NOME | QUALIFICA | MATRICOLA | Tel. LAVORO | CELLULARE | E-MAIL | SOCIAL ACCOUNT twitter/instagram |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

e con i coordinatori POCT delle strutture delocalizzate delle diverse Unità Operative;

- ha competenza per la manutenzione ordinaria e straordinaria degli strumenti, essenziale per l'uso sicuro ed efficace dei dispositivi POCT;
- verifica che la manutenzione preventiva sia eseguita secondo le modalità e la periodicità indicata dal produttore per garantire l'uso sicuro ed efficace dei dispositivi;
- verifica la registrazione di eventuali eventi avversi che causano, o potenzialmente possono causare, imprevedibili effetti che coinvolgono la sicurezza dell'operatore e del paziente;
- collabora alla stesura delle istruzioni operative e delle procedure;
- collabora agli aspetti organizzativi (ad esempio, l'implementazione dei dispositivi e dei collegamenti informatici) e alla formazione;
- supporta gli utilizzatori affinché il processo lavorativo avvenga in conformità con le procedure operative e di sicurezza codificate;
- collabora, secondo la prassi locale, alla gestione del magazzino e degli ordini.

POCT Manager nelle strutture delocalizzate (Tecnico di laboratorio/consulente infermieristico):

- autorizza solo il personale infermieristico e sanitario (ad esempio tecnici perfusionisti) con idonea formazione ad eseguire le analisi;
- raccoglie dagli utilizzatori le osservazioni e le problematiche verificate durante l'uso;
- controlla l'effettiva applicazione dei protocolli contenuti nel Manuale delle Procedure;
- cura la corretta esecuzione del CQI da parte degli operatori *in loco* e verifica periodicamente i risultati;
- ha in carico la manutenzione ordinaria, con particolare cura degli aspetti di pulizia e decontaminazione;
- ha in carico la manutenzione straordinaria degli strumenti nel proprio reparto (chiamata dell'assistenza tecnica specialistica del fornitore dello strumento);
- collabora negli aspetti organizzativi e per la formazione degli operatori;
- contribuisce alla gestione del magazzino e degli ordini;
- mantiene la documentazione degli operatori abilitati e dei risultati del controllo di qualità;

- assicura il numero di operatori necessario al volume degli esami da eseguire.

Nei casi in cui i POCT fossero presenti in una struttura extra-ospedaliera o non clinica si dovranno definire le funzioni distintive in relazione alla situazione specifica. Si potranno prevedere strutture della rete territoriale ed in particolare sistemi di telemedicina. Il personale senza una specifica formazione di laboratorio dovrebbe essere incoraggiato a creare una rete di collegamento per le attività riguardanti i POCT (23).

Operatori abilitati all'utilizzo nelle strutture delocalizzate (tecnici, infermieri ed altri operatori sanitari):

- eseguono gli esami;
- eseguono il CQI;
- segnalano eventuali disfunzioni nell'operatività al POCT Manager della struttura delocalizzata.

Servizio di Ingegneria Clinica. Questo servizio garantisce la continuità dell'erogazione del servizio dei POCT, gestendo gli strumenti di back up, quando disponibili. Laddove non siano disponibili, gli esami saranno eseguiti dal Laboratorio di riferimento. Collabora, anche, all'installazione degli strumenti e all'archiviazione dei documenti inerenti.

ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ

Al fine di garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti su sistemi POCT, è necessario identificare ed introdurre nella pratica quotidiana un sistema di assicurazione della qualità conforme a documenti riconosciuti a livello internazionale (24,25).

Controllo di processo

Per quanto la tecnologia abbia grandemente aiutato nell'assicurare l'affidabilità dei risultati, riducendo gli errori analitici, è noto che gli errori si possano generare in tutte le fasi dell'intero processo che dovrebbe pertanto essere tenuto rigorosamente sotto controllo. In particolare si dovrebbe porre attenzione alla fase pre-analitica, in quanto molte evidenze dimostrano che il maggior numero di errori si verificano nelle attività relative a questa fase. Ad esempio, la corretta scelta della tipologia dei contenitori (provette, siringhe) e/o degli anticoagulanti è fondamentale per garantire la qualità dei risultati (22). Inoltre, la valutazione del grado di comparabilità tra i risultati ottenuti sui sistemi POCT ed i risultati ottenuti in Laboratorio per lo stesso misurando, è importante per l'interpretazione dei risultati e il loro utilizzo nel processo decisionale clinico.

Controllo elettronico

Il controllo elettronico (altrimenti detto auto-check o controllo macchina) consiste in una verifica dell'elettronica dell'analizzatore per garantire l'efficienza elettronica e fluidica strumentale.

Manutenzione strumentale

La manutenzione strumentale dovrebbe essere eseguita ad ogni utilizzo della strumentazione e, nei casi di uso continuo (24 ore), almeno una volta al giorno. La manutenzione dovrebbe essere eseguita in conformità alle indicazioni del produttore.

Controllo di qualità interno (CQI)

Il CQI dovrebbe essere eseguito conformemente alle indicazioni di approvate raccomandazioni nazionali ed internazionali (26,27) che prevedono:

- almeno due livelli di concentrazione alternati per strumenti operativi 24 ore al giorno con orari cadenzati e definiti dal responsabile dei POCT;
- frequenza di controllo tarata sul carico di lavoro e sulla stabilità dei materiali. La possibilità di eseguire il CQI in automatismo totale da parte del sistema in uso, con blocco dello strumento se i valori del CQI sono fuori dai limiti stabiliti, tutela maggiormente la continuità operativa.

I materiali per il CQI presenti in commercio, essendo per lo più costituiti da matrici liquide pronte all'uso oppure liofile, dovrebbero garantire la commutabilità con i campioni da analizzare costituiti da sangue intero. Il CQI dovrebbe essere eseguito con materiale a titolo noto, ad ogni seduta analitica e per sistemi operanti 24 ore in continuo, almeno una volta al giorno. Inoltre, il CQI va effettuato ogniqualvolta si evidenziano criticità strumentali e ad ogni nuovo lotto di reagente. I risultati del CQI devono essere controllati periodicamente e conservati su supporto cartaceo e/o informatico almeno per un anno.

Valutazione esterna di qualità (VEQ)

L'adesione a programmi di VEQ e la "buona condotta" nella partecipazione sono ritenuti elementi fondamentali e qualificanti di tutti i processi di certificazione e accreditamento. Questa verifica (in ragione degli aspetti educativi della VEQ) è particolarmente importante per i siti POCT in cui più operatori con diversi livelli di competenza ed esperienza eseguono le analisi. Evidenze scientifiche hanno dimostrato che l'adesione ai programmi di VEQ migliora la qualità dei risultati e spinga i produttori a progredire nella progettazione dei sistemi analitici (23). Ogni laboratorio dovrebbe partecipare, per le analisi che esegue, ad un numero adeguato di esercizi per anno, proposti da enti organizzatori nazionali o esteri, sulla base delle disponibilità; un esempio significativo è riportato in bibliografia (28). Il Responsabile dei POCT dovrebbe scegliere i programmi di VEQ più adeguati alle caratteristiche della tipologia di dispositivo e al pannello di analiti da controllare, valutando:

- la significatività statistica per l'elaborazione dei dati;
- la disponibilità del maggior numero di costituenti per l'area di interesse;
- la presenza di livelli di concentrazione clinicamente significativi;
- la terzietà dell'Ente organizzatore dei Programmi di VEQ.

Questi ed altri importanti aspetti sono definiti dalle Linee Guida per la gestione dei programmi di valutazione di qualità della SIBioC (29). Nei casi in cui non siano disponibili in commercio programmi di VEQ, il Laboratorio dovrebbe implementare approcci alternativi per garantire la concordanza dei risultati dei POCT sotto la propria responsabilità, come richiesto da ISO 15189:2012 (20) e da documenti del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (30).

Comparabilità dei risultati

Il grado di comparabilità tra i risultati ottenuti, per lo stesso misurando, su strumentazione POCT e nel Laboratorio a cui i POCT afferiscono, dovrebbe essere valutato al fine di garantire la corretta interpretazione dei risultati. Il livello di comparabilità dei risultati relativi allo stesso misurando, determinato con strumenti e metodi diversi è un elemento importante nel percorso di assicurazione di qualità, al fine sia di garantire l'intercambiabilità nello spazio e nel tempo dei risultati, sia di evitare errori di interpretazione nel processo clinico decisionale. L'importanza di questo principio è evidente dal fatto che esso è compreso tra i requisiti dello standard ISO 15189 (20) e tra le indicazioni della direttiva Europea sulla diagnostica *in vitro* (IVD 98/79 EC) (31). Si tratta di un tema complesso, il cui elemento chiave è la definizione del livello di accettabilità delle differenze tra i risultati ottenuti su uno strumento POCT in sede decentrata e i risultati eseguiti in laboratorio. Molti lavori sono stati pubblicati sul tema; in particolare, due recenti articoli descrivono modelli sperimentali applicabili ai POCT fornendo indicazioni pratiche e criteri interpretativi (32,33).

Indicatori di Qualità

In conformità ai requisiti ISO 15189:2012, il Laboratorio responsabile dei POCT dovrebbe implementare Indicatori di Qualità per la valutazione ed il monitoraggio delle attività più critiche del processo d'esame. L'analisi periodica dei risultati ottenuti, qualora evidenziasse situazioni che possano inficiare la qualità dei risultati forniti, dovrebbe dare seguito ad azioni di miglioramento (34-37).

FORMAZIONE DEL PERSONALE

Una seria e scrupolosa preparazione di tutti gli utilizzatori costituisce uno dei capisaldi per ridurre il rischio clinico e creare un sistema sostenibile. La gestione della formazione dovrebbe comprendere gli aspetti riportati di seguito.

Orientamenti formativi

Il POCT Manager del Laboratorio dovrebbe organizzare la formazione del personale referente in laboratorio, nei reparti coinvolti e in Pronto Soccorso, con l'obiettivo di formare il maggior numero di operatori possibile (38); in situazioni di crisi, poter disporre di numeroso personale

formato consente di affrontare l'emergenza con minori incertezze. Una corretta e completa preparazione degli operatori ne aumenta la sicurezza e la resilienza in momenti critici, come si è verificato in piena emergenza COVID 19 negli ospedali delle aree italiane più colpite.

Gli orientamenti formativi dovrebbero consistere in:

- utilizzo della strumentazione, in sinergia con gli specialisti della Ditta fornitrice;
- criteri organizzativi e di gestione, sulla base delle indicazioni delle società scientifiche e le raccomandazioni emesse da enti autorevoli riconosciuti a livello nazionale ed internazionale;
- osservanza delle Procedure, Istruzioni Operative, e tutta la documentazione di interesse, emesse dal Laboratorio a cui i POCT afferiscono.

Obiettivi formativi

Secondo le specifiche necessità delle realtà sanitarie, che possono variare per dimensioni e complessità, occorre definire gli obiettivi formativi appropriati in base ad una gerarchia di accesso al sistema POCT per diversi gradi operativi. In particolare, è necessario considerare (23):

- la comprensione del funzionamento del dispositivo POCT;
- la capacità di risoluzione degli errori dello strumento;
- la comprensione dell'importanza dell'applicazione degli strumenti di assicurazione della qualità (manutenzione strumentale, CQI, VEQ, indicatori di qualità);
- la comprensione dell'importanza della corretta gestione e conservazione dei campioni, reagenti, materiali di controllo;
- la comprensione dell'importanza della corretta applicazione delle modalità operative da attuare per evitare errori inerenti la fase pre-analitica e post-analitica.

Metodologia didattica

La metodologia didattica, che fornisce gli strumenti per gestire e risolvere positivamente situazioni lavorative problematiche, dovrebbe prevedere:

- tutorial e guide installate direttamente a bordo della strumentazione, laddove disponibili;
- riunioni di aggiornamento utilizzando materiale che possa costituire oggetto di discussione e confronto (per esempio casi clinici derivati dall'esperienza *in loco*);
- pianificazione ed attuazione di ulteriori sessioni di addestramento, con verifica ad esito positivo, per gli operatori che registrano il maggior numero di NC;
- partecipazione a corsi di formazione a distanza (FAD), corsi frontali, convegni specifici;
- presentazione delle Procedure, Istruzioni Operative, e di tutta la documentazione di interesse;
- supervisione sul campo dell'operatività.

Sono oggi disponibili programmi informatici che facilitano la gestione della formazione con registrazione degli

eventi, segnalazione di necessità di ulteriori sessioni di addestramento, calendarizzazione di corsi FAD. Un'aggiornata e coerente gestione della formazione necessita di un collegamento logico-funzionale con il software di gestione POCT.

Verifica della competenza

La verifica della conoscenza/competenza raggiunta si può effettuare sia mediante esito positivo di questionari specifici e di corsi FAD, sia con riscontri pratici quali:

- riscontro della conoscenza delle Procedure e delle Istruzioni Operative, e di tutta la documentazione inerente;
- osservazione diretta dell'esecuzione di un esame (usando un campione noto, oppure un materiale di CQI o VEQ o un calibratore) con particolare attenzione agli aspetti preanalitici;
- osservazione di come l'utilizzatore registra e referta i risultati;
- osservazione diretta della manutenzione e della verifica degli allarmi di funzionamento e dei messaggi di errore, con rispettive soluzioni.

Necessità di nuovo/ulteriore addestramento (re-training)

La pianificazione di nuove sessioni di addestramento (re-training) dovrebbe:

- essere a cadenza annuale;
- essere programmati ad ogni aggiornamento tecnologico e in modo specifico e mirato;
- essere effettuati in tempi brevi in caso di "evento avverso accidentale" (15).

IL RUOLO DELL'INDUSTRIA

I produttori dei sistemi POCT si relazionano con il Direttore del Laboratorio, o un suo delegato. Ne consegue che nessun sistema POCT dovrebbe essere installato, anche in fase di dimostrazione, senza un preventivo assenso da parte del Direttore di Laboratorio, sentito e d'intesa con la Direzione Aziendale. Data la specificità del POCT, area della Medicina di Laboratorio in forte evoluzione, l'industria non può esimersi dall'impegno di un continuo confronto tra ciò che propone e ciò che è richiesto dall'organizzazione sanitaria, in un rapporto di trasparenza e chiarezza, che porti all'acquisizione di un prodotto congruente con le aspettative del paziente, del clinico e del laboratorio. In fase di post-vendita, l'industria ha il ruolo di supportare il gruppo operativo di POCT attraverso la formazione e il periodico aggiornamento delle tecnologie e dei servizi offerti, da strutturarsi in relazione ai differenti livelli di responsabilità e di operatività degli utilizzatori.

CONNETTIVITÀ

La connettività tra i sistemi informatici è una componente essenziale per una gestione efficace di

POCT all'interno di una organizzazione; essa consente che gli strumenti siano controllati e gestiti centralmente e facilita lo scambio di informazioni dal sito remoto POCT al laboratorio e al sistema informativo ospedaliero. La connettività è il fulcro dello sviluppo dei POCT (39). Gli effetti della mancanza di un'adeguata connettività si riscontrano più facilmente nelle grandi istituzioni o all'interno di sistemi multi-sito con centinaia di dispositivi e migliaia di operatori con considerevoli problemi di gestione dei dati. Revisionare manualmente le registrazioni del CQI da centinaia di dispositivi, calcolare la deviazione standard, gestire i grafici, garantire che gli errori del controllo di qualità siano considerati e corretti prima di eseguire l'esame del paziente è un'attività difficile e rischiosa se attuata con un sistema completamente manuale. I risultati manuali comportano anche il rischio di errori di trascrizione e creazione di duplicati. L'attuale presenza sul mercato di software, molto efficaci e al contempo semplici, permette di gestire anche i sistemi per la determinazione della glicemia (glucometri), la cui larghissima diffusione rende particolarmente impegnativa la loro sorveglianza. Il sistema di controllo remoto è indispensabile e dovrebbe essere previsto nel capitolato di gara.

I criteri fondamentali per la scelta e la valutazione della piattaforma informatica sono:

- possibilità di verificare lo stato di tutti gli analizzatori POCT in rete;
- tracciabilità dei risultati;
- tracciabilità dell'operatore che esegue l'esame;
- possibilità di registrare tutti gli operatori, classificati secondo i livelli di operatività;
- possibilità di bloccare l'analizzatore in caso di malfunzionamento per strumento, operatore, reparto, paziente;
- possibilità di valutare i risultati del CQI;
- possibilità di disporre di un'interconnessione con altri software in grado di supportare la gestione esperta del CQI;
- possibilità di ottenere statistiche per analizzatore, reparto, operatore, paziente;
- massima automazione della gestione dei dati per evitare errori nell'inserimento manuale e risparmiare tempo;
- possibilità di storicizzare i dati nelle cartelle cliniche e di poterne disporre nel repository aziendale per assicurare la distinzione dei risultati prodotti dai POCT da quelli provenienti dal Laboratorio centrale.

GESTIONE DEI DATI E REFERTAZIONE

Il referto dei risultati ottenuti con sistemi POCT dev'essere distinguibile immediatamente rispetto al referto del Laboratorio e dev'essere corredata da contenuti aggiuntivi che offrano più informazioni al medico (o all'operatore sanitario) fruitore dei risultati.

I dati dovrebbero essere:

- tracciati (data e ora del prelievo, dell'accettazione e del rilascio del referto);

- riferiti all'operatore che ha eseguito l'analisi, allo strumento utilizzato e al tipo di matrice (arteriosa, venosa, capillare o altro);
- riconosciuti come provenienti da un POCT (che deve essere identificato) e distinti da quelli provenienti dal Laboratorio centrale;
- trasferiti nel sistema gestionale del laboratorio;
- registrati nella cartella clinica informatizzata.

È auspicabile che il referto contenga:

- data e ora di raccolta del campione e il tempo della sua presa in carico;
- commenti sulla qualità del campione;
- interpretazione del risultato, dove e se appropriato;
- data e ora del rilascio del referto stesso;

Inoltre occorre:

- definire le procedure per la notifica immediata al medico (o altro personale clinico responsabile del paziente) quando i risultati evidenziano criticità o valori che richiedono un intervento immediato sul paziente (risultati critici);
- annotare l'errore e indicare la correzione come modifica, in caso di errori in risultati già refertati, evitando di cancellare e rendere illeggibile il dato originale.

Solo una realtà che ha implementato una gestione basata sul controllo di sistema, sulla tracciabilità delle operazioni e sulla riduzione del rischio clinico può garantire l'affidabilità dei dati forniti dai POCT e la loro immediata validazione, da parte del clinico richiedente che li utilizza in tempo reale. La tracciabilità di chi esegue l'esame costituisce, infatti, di per sé una forma di validazione tecnica. È indispensabile tracciare anche qualsiasi modifica a registrazioni o a risultati, indicando la data, l'ora e la persona che ha effettuato le modifiche.

RISCHIO CLINICO

Il rischio clinico è la probabilità che un paziente sia vittima di un evento avverso imputabile alle cure mediche prestate, tale che causi un prolungamento della degenza, un peggioramento dello stato di salute o la morte. La gestione del rischio clinico è l'insieme delle attività cliniche e amministrative intraprese per identificare, valutare e ridurre il rischio per i pazienti, per gli operatori sanitari, per i visitatori e, complessivamente, per l'organizzazione stessa. La filosofia del rischio clinico si basa quindi su una visione partecipata della sicurezza che coinvolga tutti gli operatori; il processo sistematico di identificazione e trattamento dei rischi attuali e potenziali del processo di cura (40), diventa requisito da soddisfare in base alle norme di accreditamento dei laboratori clinici (20). Poiché i processi che attengono all'utilizzo dei POCT sono diversi da quelli di un laboratorio, specialmente in relazione al flusso di lavoro, la quantificazione del rischio, che tiene conto della frequenza, della gravità e dell'individuazione del danno (41), è misurabile solo in stretta collaborazione tra laboratorio e operatori POCT. Il ruolo del laboratorio è di rendere consapevoli gli operatori

delle attività del processo a rischio di errore e di stimolare l'indagine delle potenziali cause di rischio, come quelle emanate da enti qualificati (24,42,43) che raccomandano di pianificare una strategia di assicurazione della qualità. Il piano dovrebbe essere concordato tra laboratorio e gruppo degli operatori del sito dove si usa il POCT. Di seguito alcune delle azioni da mettere in atto per mitigare il rischio di errore:

- segregazione dei dispositivi non conformi ai requisiti in modo da evitare un uso inappropriato;
- contenimento del numero di analisi da eseguire su sistemi POCT a quelle effettivamente necessarie;
- scelta di strumentazioni il più possibile semplici ed automatiche;
- certificazione delle responsabilità e delle competenze acquisite;
- riduzione delle possibilità di contatto con il materiale biologico;
- stesura di procedure di sanificazione degli strumenti periodiche e in caso di spostamento.

Il contesto specifico del POCT presenta comunque alcune tipiche criticità legate all'ambiente di utilizzo, alle condizioni cliniche e all'operatore non professionista. Tra i molti rischi identificabili vanno particolarmente riconosciuti e gestiti i seguenti:

- identificazione del paziente con modalità sicure;
- immagazzinamento corretto dei materiali di consumo;
- limitazione di ogni trascrizione manuale, in particolare dei risultati;
- impiego di un sistema analitico funzionale allo scopo clinico per il quale è stato introdotto, senza estensioni arbitrarie ad altri contesti.

Il recente esplodere della pandemia di Coronavirus ha evidenziato la necessità di indagare a fondo la gestione dei POCT, che per le loro caratteristiche possono rappresentare una possibile fonte di infezione. Infatti, l'essere trasportati da un reparto all'altro e l'uso indiscriminato in situazioni di emergenza può rappresentare un rischio aggiuntivo. I glucometri sono un esempio di POCT estremamente significativo per l'aspetto di cross-contaminazione, in quanto manipolati da molte più persone rispetto agli strumenti di laboratorio (44). Il personale utilizzatore non è sempre consapevole del rischio infettivo, specie per quanto riguarda il trasporto dei materiali e lo smaltimento dei rifiuti biologici connessi all'uso. Questi aspetti sono richiamati nel lavoro di Nichols et al. (40) e nelle Linee Guida CLSI (45). Si sottolinea, ancora una volta, l'importanza della formazione, anche in situazioni critiche, o forse, soprattutto in situazioni critiche. Un recente documento (46) sottolinea la necessità di accreditare un percorso formativo per gli utilizzatori dei POCT e si propone, tra le altre finalità, l'obiettivo di rendere più consapevole l'opinione pubblica dei benefici derivanti dal corretto utilizzo POCT. In situazioni di crisi e in aree geografiche in cui le risorse sanitarie sono fortemente limitate, una valida formazione potrebbe abilitare gli operatori ad effettuare diagnosi e triage nel "luogo di necessità" (point

of need) sempre tuttavia assicurando il supporto di una consulenza da parte dei professionisti di laboratorio.

ESEMPI DI POCT TERRITORIALI

Di seguito sono illustrati alcuni esempi integrativi di impiego dei POCT: i glucometri e i coagulometri portatili (INR Portable Monitor) sono stati scelti per il loro largo impiego, mentre i test molecolari per le particolari criticità interpretative che presentano.

Si accenna, anche, all'utilizzo di test estremamente semplificati (test rapidi spesso denominati "saponette") il cui uso indiscriminato, in tempi recenti ha posto e porrà ancora parecchi problemi. Le informazioni sull'avanzamento tecnologico devono circolare tempestivamente tra chi ha la responsabilità di scelta e gestione dei POCT, per ridurre il rischio clinico ed aumentare la sicurezza nell'uso degli strumenti. Per questi motivi le "reti" informatiche, informative e professionali sono fondamentali per tutto ciò che attiene alla medicina di laboratorio delocalizzata, che costituisce, per sua stessa natura, un network di strumenti e di persone.

Gli esempi riportati non si limitano ai sistemi POCT gestiti all'interno di contesti ospedalieri, come trattato fino ad ora, ma riportano anche esempi per diverse finalità di utilizzo.

Glucometri e glicemia

Il glucometro portatile con strisce reattive è lo strumento per analisi decentrate più diffuso ed utilizzato in assoluto. Diverse altre tipologie di strumenti sono impiegate per la determinazione decentrata della glicemia, in particolare gli emogasanalizzatori presso reparti di cura ospedalieri. Le considerazioni relative a questi analizzatori sono assimilabili a quelli della chimica clinica POCT, mentre di seguito ci si riferisce ai glucometri portatili. La semplificazione del metodo analitico, con l'impiego di chimica secca reidratata direttamente dal campione biologico, ed il tempo di analisi limitato a pochi secondi non consentono di ottenere prestazioni confrontabili con quelle del laboratorio, in particolare per quanto attiene alla precisione, alla sensibilità, agli interferenti. Quindi il ruolo del laboratorio dovrebbe considerare obiettivi diversificati a seconda dello scopo per il quale sono utilizzati questi strumenti.

I campi di applicazione possono essere distinti con la seguente classificazione basata sulla possibilità e capacità del laboratorio di fornire raccomandazioni e monitorarne le prestazioni.

Autocontrollo del paziente diabetico

- controllo multiorario da sangue capillare;
- monitoraggio glicemico continuo;

Impiego da parte di personale sanitario senza l'intervento diretto del laboratorio

- strutture residenziali assistite (residenze per anziani, case di reclusione, farmacie);

- sul territorio (urgenze sanitarie, ambulatori medici) Impiego in strutture sanitarie con gestione del laboratorio;
- reparti di degenza ospedaliera;
- terapie intensive per il controllo stretto della glicemia.

Autocontrollo

La norma ISO 15197:2015 è un documento specifico che tende a garantire la disponibilità sul mercato di metodi con prestazioni analitiche adeguate all'uso personale da parte del paziente diabetico o di un suo familiare, finalizzato alla determinazione della dose insulinica da somministrare (47). Questo documento ha anche introdotto due modelli specifici di valutazione dell'accuratezza rappresentati dalla "Error grid" e dal "Mean absolute relative difference (MARD)". Si tratta di strumenti che comunque presentano limitazioni nell'applicazione diffusa in quanto richiedono modalità molto rigorose di metodi di riferimento per la determinazione del glucosio sullo stesso campione, generalmente rappresentato dal sangue capillare. Queste valutazioni sono quindi a carico dei produttori e assegnate a laboratori di prova. Nel diabete di tipo 1 l'automonitoraggio è documentato da prove di efficacia di livello elevato; nel diabete di tipo 2 prove di efficacia limitate sono documentate per i pazienti in terapia con insulina, ancor meno al di fuori della terapia insulinica (48-50). Il controllo di qualità nell'automonitoraggio può consistere nelle semplici due fasi: il controllo elettronico presente nel sistema analitico e le verifiche periodiche per confronto con metodo alternativo in occasione dei controlli diabetologici periodici.

Un caso diverso è il monitoraggio continuo della glicemia condotto sul liquido interstiziale, matrice che introduce ulteriori variabili per la valutazione di accuratezza. Vi sono prove di efficacia per questa applicazione in particolare nel diabete tipo 1 e nei sistemi con pompa insulinica collegata (51). Più recentemente è stato sviluppato il monitoraggio transcutaneo nell'infrarosso che offre delle prospettive interessanti ma richiede ulteriori sviluppi ed una sorveglianza del laboratorio. Per queste tipologie di analisi le raccomandazioni per i laboratori sono limitate alle seguenti fasi:

- il laboratorio dovrebbe essere coinvolto nella valutazione e scelta degli strumenti adottati dalle strutture sanitarie e diabetologiche;
- il laboratorio dovrebbe offrire supporto alle strutture diabetologiche nella definizione della formazione dei pazienti o di loro assistenti.

Impiego da parte di personale sanitario nel territorio

Si tratta di condizioni di impiego dove la connettività con il laboratorio presenta al momento difficoltà sia tecniche che pratiche, ma vi è un'assunzione di responsabilità da parte di sanitari addetti alla cura. In questi casi l'adozione di un programma di controllo di qualità con materiali liquidi è necessario, a tutela dei

pazienti ed anche degli operatori. I livelli minimi qualitativi sono quelli della norma ISO 15197 che assicura un livello di accuratezza sufficiente per la gestione di urgenze mediche e terapia nel paziente diabetico, ma non è adeguato a porre diagnosi di diabete mellito (52).

Di conseguenza le indicazioni sono:

- il laboratorio dovrebbe essere coinvolto nelle fasi di scelta dei glucometri e nella formazione degli operatori;
- tale formazione dovrebbe includere anche informazioni sulle prestazioni analitiche, i rischi legati alle sostanze interferenti e il controllo di qualità;
- la verifica esterna di qualità, o approcci alternativi basati sul confronto periodico di dati, sono raccomandati;
- questa tipologia di strumenti non va utilizzata per programmi di screening diagnostici.

Impiego in strutture sanitarie con il coinvolgimento diretto del laboratorio

Si tratta principalmente di ambito ospedaliero dove l'esigenza riguarda un'attività analitica frequente e dedicata a pazienti fragili. In queste condizioni infatti le prestazioni vanno attentamente monitorate perché i risultati determinano decisioni immediate, vi è una responsabilità cogente nella cura dei pazienti e più frequentemente in questo contesto si possono incontrare situazioni limitanti l'accuratezza analitica. Vanno a questo proposito ricordati i seguenti aspetti: il sito di prelievo (è necessario sempre verificare che la matrice usata sia stata validata dal produttore); l'anemia o un elevato ematocrito; lo stato di ipo-perfusione periferico; la vasocostrizione; lo shock; la presenza di interferenti (acido urico, destrosio, acido ascorbico, altre sostanze o farmaci). Per mantenere attivo il presidio del laboratorio, è in primo luogo indispensabile la connettività e personale dedicato a questa sorveglianza sugli strumenti POCT, che possono anche essere numerosi. Un caso particolare è rappresentato dal controllo stretto della glicemia in terapia intensiva con limiti particolarmente stringenti (generalmente di 4,5-6,0 mmol/L; 80-110 mg/dL). Diversi studi hanno ottenuto risultati contraddittori, dimostrando un miglioramento degli esiti dei pazienti ma esponendo gli stessi a gravi rischi di ipoglicemia. Un monitoraggio con il solo glucometro risulta comunque non idoneo a questo scopo, a causa dei limiti mostrati nell'identificare l'ipoglicemia, la possibile sovrastima da interferenti, il mancato controllo dell'ipo-potassiemia che si sviluppa a seguito dell'uso dell'insulina (53).

Le indicazioni di conseguenza sono le seguenti:

- pianificazione dell'impiego dei glucometri coordinata dal laboratorio, dalla scelta del sistema alla formazione, alla vigilanza;
- piena connettività con applicazioni adeguate a monitorare le prestazioni, inibizione dell'uso degli strumenti in caso di prestazioni non accettabili,

identificazione degli operatori e la loro storia formativa, possibilmente anche integrando i risultati in tempo reale;

- rapporti periodici gestiti dal laboratorio per ogni strumento in uso e per i dati della verifica esterna di qualità;
- adozione di un sistema sicuro di identificazione del paziente;
- non impiegare glucometri in "critical care" e/o in pazienti critici per il monitoraggio stretto della glicemia, a meno di utilizzare glucometri certificati per tale uso.

INR e portable monitor

La terapia anticoagulante orale (TAO) è un trattamento salva-vita che oggi coinvolge in Italia più del 2% della popolazione generale, ovvero circa 1 500 000 pazienti. Sino a pochi anni fa tutti i pazienti in terapia anticoagulante orale assumevano farmaci ad azione anti-vitamina K (AVK, i dicumarolici Coumadin o Sintrom) per i quali, a causa della stretta finestra terapeutica, è necessario il monitoraggio di laboratorio tramite l'International Normalized Ratio (INR), modalità di espressione del risultato del tempo di protrombina per i pazienti in TAO. Il notevole incremento del numero dei pazienti in TAO (15% su base annua) (54) ha reso affollati i Centri di Sorveglianza e ha reso difficile la loro gestione creando inoltre disagi importanti ai pazienti. La decentralizzazione della TAO, utilizzando coagulometri portatili, riduce in maniera significativa queste problematiche; l'uso degli INR-Portable Monitor (INR-PM) (55) è quindi sempre più diffuso, soprattutto in presidi sul territorio (case della salute, case di riposo, ambulatori medici, farmacie); questo generale incremento è dovuto principalmente a due fattori. Nonostante la diffusione dei farmaci DOAC (Direct Oral AntiCoagulants) rimane una quota importante di pazienti scoagulati (quasi il 50% del totale) (56) che per diversi motivi (valvole cardiache, insufficienza renale e/o epatica, scarsa compliance) deve essere trattata con gli AVK. Inoltre esistono in Italia, (data la natura del territorio e la carenza di infrastrutture) molte zone geografiche con difficoltà logistiche, dove i coagulometri portatili sono estremamente utili per rendere facilmente accessibili ai pazienti i controlli dell'INR e le relative decisioni terapeutiche.

Alcuni problemi sono tuttavia da sottolineare:

- allineamento con i risultati del laboratorio di riferimento: diversi lavori però hanno ormai dimostrato da anni ottimi fattori di correlazione tra le misure di INR ottenuti sui PM e sui coagulometri dei laboratori, con valori fino all'85-90% di concordanza (57,58);
- modalità di trasmissione dati; non tutti i POCT hanno una trasmissione wireless, che rimane un fattore importante per facilitare la comunicazione tra i diversi soggetti interessati (paziente, medico curante, laboratorio di riferimento). La connettività

con le unità di cura periferiche dev'essere ottenuta mediante sistemi di telemedicina;

- formazione per il personale che esegue l'esame; spesso tale personale manca di una specifica preparazione di laboratorio e occorre sempre sottolineare l'importanza della fase pre-analitica vista la possibilità di una immediata attivazione della cascata coagulativa.

L'assicurazione di qualità è uno dei principali problemi riguardanti gli INR-PM. I produttori degli strumenti forniscono usualmente il software per la gestione del CQI insieme al materiale di controllo; il problema fondamentale è costituito dalla matrice, di solito un plasma liofilizzato da sciogliere e preparare. In alcune realtà sono stati sviluppati dei sistemi per la gestione del CQI e ormai su diversi apparecchi il coefficiente di variabilità (CV) intra-serie è del circa il 5% (59). Laddove non sia possibile eseguire una VEQ, almeno la valutazione della congruità dei risultati con quelli ottenuti nel laboratorio di riferimento e un programma di confronto inter-laboratori costituiscono un'alternativa importante (60).

Opportunità dell'utilizzo degli INR-PM sul territorio

C'è una forte motivazione per il medico di base, per conoscere immediatamente il risultato dell'esame; l'INR-PM evita ritardi ed errori nella trasmissione del risultato e nella conseguente decisione terapeutica. Valutare il risultato insieme al paziente è poi rassicurante sia per il medico che per la persona in trattamento. (61). L'automonitoraggio dell'INR da parte del paziente ha portato in Germania ad un ottimo risultato del Time in Therapeutic Range (TTR) che (a seconda dei pazienti) raggiunge il 70-90%. Nell'84-87% di misure parallele i risultati dell'INR non differivano di più di 0,5 unità INR dai coagulometri di laboratorio. Esiste anche una forte spinta verso l'autogestione del paziente (patient self management -PSM) (41).

Punti fondamentali

La collaborazione tra gli utilizzatori, i medici curanti, i laboratori di riferimento e i produttori dei POCT è assolutamente essenziale. In molte pubblicazioni non viene però tenuto conto della valutazione da parte del Medico Curante (62), aspetto che riveste invece un'importanza maggiore in ambito di cure primarie.

Rimane nel nostro Paese lo scoglio del rimborso dell'esame, laddove in molte nazioni (ad esempio UK, Germania, Olanda), il servizio sanitario o le assicurazioni contribuiscono alla spesa. In Italia viene talvolta formulata l'obiezione sul maggior costo dell'esame singolo rispetto all'esame eseguito in laboratorio, senza però che sia valutata l'economicità degli INR-PM che escludendo i costi aggiuntivi del trasporto dei campioni al laboratorio, il costo del trasferimento dei pazienti (costo anche psicologico) fino al Centro TAO e l'impegno del personale di laboratorio.

In conclusione:

- il laboratorio dovrebbe essere coinvolto nelle fasi di scelta degli strumenti e nella formazione degli utilizzatori;
- tale formazione dovrebbe includere anche indicazioni riguardo il controllo di qualità, da eseguire secondo le indicazioni dei Centri di Sorveglianza della TAO o dei laboratori di riferimento;
- i programmi di VEQ (o programmi di confronto con i laboratori di riferimento) sono fortemente raccomandati.

Esami molecolari

Relativamente agli esami volti a rilevare la presenza (ed eventualmente misurare) materiale genetico, DNA e/o RNA, la necessità, a livello mondiale, di individuare la presenza di SARS-CoV-2 ha generato una fortissima espansione di ricerca con nuove tecnologie analitiche che stanno comparando insieme alla possibilità di applicazioni su smartphone per ottenere il collegamento di POCT a reti integrate. La maggior parte degli esami molecolari eseguiti con strumentazione POCT interessa attualmente la microbiologia, dove l'uso dei POCT è ormai una realtà consolidata, con ampia scelta tra strumenti diversi e un gran numero di esami per vari agenti patogeni quali virus (HIV, HBV, HCV, virus influenzali, RSV, SARS-CoV-2,) batteri, parassiti e funghi (63). Tecnologie come Multiplex (MPOCT) (64), CRISPR-based diagnostic (65), amplificazione isoterma Loop-mediated-Isothermal Amplification (LAMP) e altri, consentono di ottenere in tempi brevi i risultati (66). La disponibilità di simili dispositivi consente una diagnostica infettivologica anche in situazioni di urgenza e al di fuori del Laboratorio. Essi permettono anche una più adeguata e veloce applicazione della terapia antibiotica e la verifica di eventuali resistenze. Nondimeno esiste sempre la necessità di integrare il singolo risultato nel quadro clinico, anche per dirimere eventuali dubbi (risultati borderline, o incoerenti con la situazione del paziente o con risultati precedenti). L'uso corretto, come viene fatto in alcune realtà (ad esempio nella giurisdizione della Medicina Penitenziaria), è di eseguire l'esame *in loco* e di inviare il dato al laboratorio, così che sia integrato nel contesto clinico pertinente. Purtroppo la semplicità d'uso e la facilità d'installazione determinano il rischio di una diffusione inopportuna (e irrecuperabile) di tali strumenti in ambiti che mancano della necessaria competenza, con costi fuori controllo e situazioni pericolose a livello d'intervento medico.

Esistono poi strumenti POCT che indagano varianti genetiche. Nell'ambito delle indagini coagulative, pochissimi strumenti eseguono esami per varianti genetiche. I più validi e diffusi si limitano alla ricerca di poche mutazioni quali, ad esempio, la mutazione G20210 A del Fattore II e la mutazione G1691A del Fattore V, meglio nota come FV Leiden. Tuttavia, il singolo riscontro di presenza/assenza di mutazione

deve essere interpretato nel contesto clinico e di altri risultati di laboratorio, per evitare pericolosi equivoci.

Analogamente, nell'ambito della genetica oncoematologica, un esempio è la determinazione del prodotto del gene *BCR ABL* assai importante per il monitoraggio della terapia antineoplastica (67), oggi eseguibile con POCT (68). Poiché la regolare e frequente misura del trascritto genico è indispensabile anche per l'accertamento di eventuali ricadute, la semplicità d'uso e la rapidità della risposta *in loco* rendono possibile, un accurato monitoraggio (69).

Lo sviluppo di tecnologie nuove si sussegue a ritmo serrato (70) rendendo molto difficile la scelta dei dispositivi e l'attendibilità dei risultati che, senza il contesto del quadro clinico, di altri dati genetici e di laboratorio, possono ingenerare gravi errori terapeutici. Fortunatamente, in Italia, l'esecuzione di esami di genetica umana richiede due condizioni vincolanti quali il consenso del paziente e la richiesta di uno specialista (ematologo, oncologo) (71).

Indicazioni:

- mantenere un aggiornamento costante su letteratura e stato dell'arte;
- riservare l'uso dei POCT solo a ristretti ambiti sanitari gestiti;
- promulgare la necessità di una normativa che regoli l'uso dei POCT

Test rapidi (o speditivi)

I test rapidi sono definiti come *“test qualitativi o semi-quantitativi, per uso singolo e/o in piccole serie, che non richiedono particolare strumentazione e sono progettati per dare il risultato in tempi rapidi, di solito intorno ai 30 minuti”* (72). Già utilizzati in molti ambiti diagnostici, si sono diffusi enormemente a causa della pandemia dovuta al SARS-CoV-2, durante la quale necessità e urgenza hanno spinto sul mercato un gran numero di questi dispositivi. La loro attuale proliferazione, legata all'effetto pandemico rappresenta un paradigma per valutare utilizzo e limiti di tali test, applicabile anche ad altri campi della diagnostica delocalizzata.

La pandemia da COVID-19 ha evidenziato che i test rapidi, che rappresentano una vasta e varia realtà, possono incidere sulle decisioni di operatori sanitari e responsabili politici; la comprensione dei loro punti di forza e dei loro limiti è quindi fondamentale per definire la corretta strategia di utilizzo (73,74). La conoscenza dei loro limiti, infatti, permette di valutarne l'applicabilità in contesti di emergenza in cui si evidenziano situazioni critiche e in continua evoluzione (75). La scarsa qualità analitica di alcuni test ha fatto scadere la credibilità complessiva, tanto che il diffuso appellativo di “saponette” assume un significato vagamente spregiativo. È pertanto assolutamente indispensabile, prima dell'utilizzo, valutare la sensibilità e specificità diagnostica dei test utilizzati, al fine di accertarne la conformità ai requisiti richiesti dalle normative vigenti (ad esempio Ministero della Salute, Istituto Superiore di

Sanità) e dalle raccomandazioni di Organismi Internazionali riconosciuti (ad esempio Organizzazione Mondiale della Sanità, Centre for Disease Control -US-, IFCC) e definire le specifiche del loro utilizzo mediante approvati algoritmi diagnostici.

Il termine “saponette”, utilizzato da tempo per indicare i test speditivi (inevitabilmente oggi ancora più diffusi) è da ritenersi inadeguato e fuorviante, per gli aspetti di “falsa sicurezza e banalità” collegati al vocabolo. Si propone qui invece l'esempio della Francia, dove è usato l'acronimo TROD (Test Rapides d'Orientation Diagnostique - test rapidi d'orientamento diagnostico), secondo il disciplinare che ne regola l'utilizzo (76). Questa sigla rende l'idea di una risposta in tempi veloci, insieme al valore “orientativo” del risultato, come ben specificato nella norma francese, che potrebbe essere un interessante riferimento anche per lo sviluppo di una disposizione normativa italiana.

Poiché la diagnostica da SARS-CoV-2 su sistemi POCT è in continua evoluzione e innovazione, si è ritenuto di non affrontare la tematica specifica in questo documento, ma di rimandare gli approfondimenti alla letteratura scientifica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano sentitamente i molti colleghi e colleghe, di varie Regioni italiane, che hanno fornito nel tempo utili indicazioni alla stesura del documento.

Particolare gratitudine va riservata a: Ada Aita (Padova), Laura Auriemma (Seriante), Massimo De Paschale (Legnano), Chiara Novelli (Legnano), Sophie Testa (Cremona), Matteo Vidali (Milano), che hanno contribuito, con le loro osservazioni ed esperienza specifica, ad arricchire e aggiornare il contenuto di queste raccomandazioni.

Many thanks to Maria Gabriella Hartley Pezzo (New York) for revising the English Abstract. We are also grateful to Prof Michel Vaubourdoille (Paris) Prof Ian Farrance (Melbourne) and Prof Mark Shepard Adelaide for useful suggestions and relevant indications.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Di Serio F, Trenti T, Carraro P. Raccomandazioni per l'implementazione e la gestione del “point-of-care testing” (POCT). *Biochim Clin* 2011;35:242-52.
2. Point Of Care Diagnostics & Testing Market Worth \$35.74 Billion By 2028 <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-point-of-care-diagnostics-market> (ultimo accesso: marzo 2021)
3. Global Point of Care Testing (POCT) market insights, Forecast to 2025 <https://www.360marketupdates.com/global-point-of-care-testing-poct-market-13717053> (ultimo accesso: marzo 2021)
4. Point of Care Diagnostic Market in US – Industry Outlook and Forecast 2019-2024. <https://www.360marketupdates.com/global-point-of-care-testing-poct-market-13717053>

- [//www.researchandmarkets.com/reports/4749338/point-of-care-diagnostics-market-in-us-industry?](http://www.researchandmarkets.com/reports/4749338/point-of-care-diagnostics-market-in-us-industry?) (ultimo accesso marzo: 2021)
5. Vashist SK, Luong JHT. Point of care technologies enabling next generation healthcare monitoring and management. Springer Edition. 2019.
 6. Greaves RF, Bernardini S, Ferrari M, et al. Key questions about the future of laboratory medicine in the next decade of the 21st century: a report from the IFCC-Emerging Technologies Division. *Clin Chim Acta* 2019;495:570-89.
 7. Coppolecchia P, Drago C, Rossi L, et al. PoCT e diagnostica decentrata. UPDATE 2016. Posizione SIPMeL del GdS Point of Care Testing. *Riv Ital Med Lab* 2016;12:14-25.
 8. Academy of Medical Laboratory Science, Association of Clinical Biochemists in Ireland, Irish Medicines Board et al. (AMLS-ACBI). Guidelines for Safe and Effective Management and Use of Point of Care Testing. 2007. <https://www.hse.ie/eng/services/publications/clinical-strategy-and-programmes/guidelines-for-point-of-care-testing.pdf> (ultimo accesso: aprile 2021)
 9. Academy of Medical Laboratory Science, Association of Clinical Biochemists in Ireland, Irish Medicines Board et al. (AMLS-ACBI). Guidelines for Safe and Effective Management and Use of Point of Care Testing in Primary and Community Care. 2009. <https://www.hse.ie/eng/services/publications/poc-primary-and-community.pdf> (ultimo accesso: aprile 2021)
 10. Dutch Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (NVKC). Guideline Point of care testing in primary care in the Netherlands. National Institute for public health and the environment (RIVM) Report 360121001/2012. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/360121001.pdf> (ultimo accesso: aprile 2021)
 11. Oliver Saez P, Diaz RA, Liron Hernández J, et al. Guía sobre las pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia al paciente (POCT). *Rev Lab Clín* 2016;2:60-80.
 12. Académie nationale de Pharmacie. Rapport de l'Académie nationale de Pharmacie - Autotests-TROD Rôle du pharmacien d'officine. Décembre 2017. Académie nationale de Pharmacie. Rapport de l'Académie nationale de Pharmacie - Autotests-TROD Rôle du pharmacien d'officine. Décembre, 2017. https://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_autotests_TROD_VF9_2018.03.22.pdf (ultimo accesso: aprile 2021)
 13. Shepard M. ed. A Practical Guide to Global Point-of-Care Testing. CSIRO Publisher 2016.
 14. Farrance I. Policies, procedures and guidelines for Point of care testing. RCPA quality Assurance Programs Pty Ltd. Review. 2012. <https://www.aacb.asn.au/documents/item/635> (ultimo accesso: aprile 2021).
 15. Murff HJ, Patel VL, Hripcsak G, et al. Detecting adverse events for patient safety research: a review of current methodologies. *J Biomed Inform* 2003;36:131-43.
 16. College of American Pathologists (CAP). Point of Care Testing Toolkit. <http://ebooks.cap.org/product/pointofcare-testing-toolkit> (ultimo accesso: marzo 2021).
 17. Dubai Health Authority. Point-of-Care-Testing Guidelines. Health Regulation Department. 2016 <https://www.dha.gov.ae/Documents/HRD/Point%20of%20Care%20Testing%20Guidelines.PDF> (ultimo accesso: aprile 2021).
 18. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Essential tools for implementation and management of Point-of-Care-Testing; approved guideline, 3th ed. CLSI document POCT04. CLSI Wayne, PA, 2016.
 19. ISO 22870:2017 Point of care testing (POCT). Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2017.
 20. ISO15189:2012 Medical laboratories - Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization: Geneva 2012.
 21. Rampoldi E, Patrucco G. Disposizioni normative in Italia per la gestione dei Point of Care Testing: un'indagine SIBioC nelle regioni italiane. *Biochim Clin* 2018;42:313-7.
 22. Florkowski C, Don-Wauchope A, Gimenez N, et al. Point-of-care testing (POCT) and evidence-based laboratory medicine (EBLM) – does it leverage any advantage in clinical decision making? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017;54:471-94.
 23. Nichols JH, Alter D, Chen Y, et al. AACC Guidance Document on Management of Point-of-Care Testing. *J Appl Lab Med* 2020 doi:10.1093/jalm/jfaa059.
 24. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Quality Management: Approaches to Reducing Errors at the Point of Care; approved guideline, 1st ed. CLSI Document POCT07-A. CLSI Wayne, PA, 2010.
 25. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Selection Criteria for Point-of-Care Testing Device; approved guideline, 1st ed. POCT09-A. Wayne, PA, 2010.
 26. Ottomano D, Ceriotti F, Galeazzi M, et al. Linee Guida per gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno. *Biochim Clin* 2008;32:102-21.
 27. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; approved guideline, 3th ed. CLSI Document C24-A3. CLSI Wayne, PA, 2006.
 28. Commission suisse pour l'assurance de qualité dans le laboratoire médical (QUALAB) https://www.qualab.swiss/view/data/6254/Interne%20Qualit%C3%A4tskontrolle/Text%20direkt/CQI_Position_QUALAB_f.pdf (ultimo accesso : marzo 2021).
 29. Ceriotti F, Secchiero S, Sciacovelli L, et al. Linee Guida per la gestione dei programmi di Valutazione Esterna di Qualità. *Biochim Clin* 2011;35:107-26.
 30. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Using Proficiency Testing and Alternative Assessment to Improve Medical Laboratory Quality, 3rd ed. CLSI Document QMS24. CLSI Wayne, PA, 2016.
 31. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices <http://data.europa.eu/eli/dir/1998/79> (ultimo accesso: marzo 2021).
 32. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
 33. Vidali M, Padoan A, Dittadi R. Protocollo operativo per la verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche. *Biochim Clin* 2019;43:228-43.
 34. Cantero M, Redondo M, Martín E et al. Use of quality indicators to compare point-of-care testing errors in a neonatal unit and errors in a STAT central laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53:239-47.
 35. Sciacovelli L, Plebani M. The IFCC Working Group on laboratory errors and patient safety. *Clin Chim Acta* 2009;404:79-85.
 36. Oliver P, Fernandez-Calle P, Mora R, et al. Real-world use of key performance indicators for Point-of-Care Testing network accredited by ISO 22870. *Pract Lab Med* 2020 doi.org/10.1016/j.plabm.2020.e00188;
 37. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Development and using of Quality Indicators for Laboratory Medicine improvement, 2nd ed. CLSI Document QMS12. CLSI Wayne, PA, 2019.
 38. Briggs C, Guthrie D, Hyde K, et al. Guidelines for POCT in haematology. *British J Haem* 2008;6:857-1002.

39. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Point-of-Care Connectivity; approved standard, 2nd ed. CLSI document POCT01-A2. CLSI Wayne, PA, 2006.
40. Nichols JH. Risk management for point-of-care testing. *JIFCC* 2014;25:154-61.
41. Luppia PB, Junker R. Point-of-Care Testing Principles and clinical applications Ed. Springer Verlag 2018.
42. ISO 22367:2020 Medical laboratories - Application of risk management to medical laboratories. International Organization for Standardization: Geneva 2020.
43. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Implementation Guide of POCT01 for Health Care Providers; approved guideline. CLSI document POCT02-A. CLSI Wayne, PA, 2008.
44. Vanhaeren S, Dupont C, Magneney M, et al. Bacterial contamination of glucose test strips: not to be neglected. *Am J Infect Control* 2011;39:611-3.
45. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Planning for Laboratory Operations During a Disaster; approved guideline. CLSI Document GP-A. CLSI Wayne, PA, 2014.
46. Kost GJ, Zadrán A, Zadrán L, et al. Point-Of-Care-Testing Curriculum and Accreditation for Public Health-Enabling Preparedness, Response and Higher Standards of Care at Points of Need. *Frontiers in public health. Front Public Health* 2019;6:385.
47. ISO 15197:2013 In vitro diagnostic test systems. Requirements for blood-glucose monitoring systems for self testing in managing diabetes mellitus. International Organization for Standardization: Geneva 2013.
48. American Diabetes Association. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020; 43(Supplement 1): S32-S36.
49. National Institute for Health and Care Excellence. 2020. Managing blood glucose in adults with type 2 diabetes. <http://pathways.nice.org.uk/pathways/type-2-diabetes-in-adults> (ultimo accesso: agosto 2020).
50. Gruppo di lavoro AMD - SID - SIEDP - OSDI - SIBioC - SIMeL. Documenti di Consenso Intersocietario: Raccomandazioni per l'autocontrollo della glicemia nel paziente diabetico. *JAMD* 2013;16:199-202.
51. Langendam M, Luijck YM, Hooft L, et al. Continuous glucose monitoring systems for type 1 diabetes mellitus (2012). *Cochrane database of systematic reviews*. doi/10.1002/14651858.CD008101.pub2 (ultimo accesso: marzo 2021).
52. Klonooff DC. Point-of-Care Blood Glucose Meter Accuracy in the Hospital Setting. *Diabetes Spectr* 2014;27:174-9.
53. Boyd JC, Bruns DE. Performance requirements for glucose assays in intensive care units. *Clin Chem* 2014;60:1463-5.
54. Parretti D, Grilli P, Bastiani F, et al. Documento di consenso SIMG-FCSA sulle corrette procedure di anticoagulazione di anticoagulazione. <http://www.centrifcsa.it/Content/DocumentiChiSiamo/DOCUMENTO%20FINALE%20CONSENSUS%20SIMG%20FCSA%20febbraio%202018.pdf> (ultimo accesso: marzo 2021)
55. Testa S, Paoletti O, Alatri A, et al. TAO: meglio la Medicina di Base o i Centri di sorveglianza? *RIMeL - IJLaM* 2009;5:160-5.
56. L'uso dei farmaci in Italia - Rapporto OsMed 2019 <https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1205984/rapporto-o-osmed-2019.pdf> (ultimo accesso: marzo 2021)
57. Ryan F, O'Shea S, Byrne S. The reliability of point-of-care prothrombin time testing. A comparison of CoaguChek S® and XS® INR measurements with hospital laboratory monitoring. *Int J Lab Hematol* 2010;32:e26-33
58. Dauphin C, Legault B, Jaffeux P, et al. Comparison of INR stability between self-monitoring and standard laboratory method: Preliminary results of a prospective study in 67 mechanical heart valve patients. *Archiv Cardiovasc Dis* 2008;101:753-61.
59. Testa S, Paoletti O, Bassi L, et al. A global quality control system to check PT-INR portable monitor for antivitamin K antagonists. *Int J Lab Hematol* 2015;37:71-8.
60. Mooney C, Byrne M, Kapuya P et al. Point of care testing in general haematology. *Br J Haematol* 2019;187:296-306.
61. Murray ET, Fitzmaurice DA, Mc Cahon D. Point of care testing for INR monitoring: where are we now? *Br J Haematol* 2004;127:373-8.
62. Lindervelder D, Koffijberg H, Kusters R, et al. Point-of-care testing in primary care: A systematic review on implementation aspects addressed in test evaluations. *Int J Clin Pract* 2019;73:e13392.
63. Shimetani N. Potential of Next-generation POCT in Infectious Disease Rapid Test. *Med Mycol J* 2017;58:91-4.
64. Alp A. Advancement in POCT Molecular Testing: The Multiplex PCR POCT Devices for Infectious Diseases. *EJIFCC* 2018;29:205-9.
65. Hou T, Zeng W, Yang M, et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for SARS-CoV-2. *PLOS Pathog* 2020;16: e1008705.
66. John Hopkins Medical School. <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/SARS-CoV-2/molecular-based-tests/index.html> (ultimo accesso: marzo 2021).
67. McDermott U, Downing JR, Stratton MR. Genomics and the Continuum of Cancer Care. *N Engl J Med* 2011;364:340-50.
68. Day GJ, Lockwood C, Payton JE, et al. Development of Xpert® BCR-ABL Ultra, an Automated and Standardized Multiplex Assay with Required Performance Characteristics for BCR-ABL1 Quantitative Measurement on an International Reporting Scale. *Blood* 2015;126:2793.
69. Shanmuganathan N, Hughes TP. Molecular monitoring in CML: how deep? How often? How should it influence therapy? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2018;1:168-76.
70. Hayes B, Murphy C, Crawley A, et al. Developments in Point-of-Care Diagnostic Technology for Cancer Detection. *Diagnostics* 2018;8:39-56.
71. Accordo tra il Ministro della salute, le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano sul documento recante: «Linee-guida per le attività di genetica medica». (Accordo ai sensi dell'art. 4, del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281). *Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.224 del 23-09-2004*.
72. Official Journal of the European Union 2009/108/EC. Amending Decision 2002/364/EC on common technical specifications for in vitro -diagnostic medical devices. Document number C (2009) 565. [https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2009/108\(1\)/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2009/108(1)/oj) (ultimo accesso: marzo 2021).
73. <https://www.finddx.org/SARS-COV-2/sarsCOV2-eval/> (ultimo accesso: marzo 2021).
74. Shah A, Shuren J. Insight into FDA's revised policy on antibody tests; prioritizing access and accuracy. *Food and Drug Administration*. 05/04/2020. (<https://www.fda.gov/news-events/fda-voices/insight-fdas-revised-policy-antibody-tests-prioritizing-access-and-accuracy>) (ultimo accesso: marzo 2021)
75. 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. doi: 10.1002/14651858.CD013652.
76. Académie Nationale de Pharmacie. Rapport de l'Académie nationale de Pharmacie - Autotests-TROD Rôle du pharmacien d'officine. Décembre 2017. https://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_autotests_TROD_VF9_2018.03.22.pdf (ultimo accesso : marzo 2021).

Procalcitonin may help in diagnosing bacterial infections in COVID-19 patients during high-dose steroid therapy

Ayşe Batirel¹, Nurullah Eser¹, Ezgi Korlu¹, Mehmet Engin Tezcan²

¹Kartal Lutfi Kırdar City Hospital, Department of Infectious Diseases, Istanbul, Turkey

²Kartal Lutfi Kırdar City Hospital, Department of Rheumatology, Istanbul, Turkey

Key words: *Coronavirus disease-19, procalcitonin, bacterial infection*

Dear Editor,

SARS-CoV-2 infection (COVID-19) is a multi-system disease that mainly affects the lung from mild pneumonia to acute respiratory distress syndrome (1). It has recently been shown that high-dose steroid therapy can reduce mortality rate in hypoxic COVID-19 patients (2). In these cases, the diagnosis and the monitoring of a bacterial infection may be a challenging issue (3). Since procalcitonin (PCT) is a well-established marker for systemic bacterial infection, it can be used during high-dose steroid therapy to distinguish clinical and laboratory alterations due to the uncontrolled inflammation caused by COVID-19 from bacterial superinfection (4). In our hospital, the COVID-19 patients receive high dose steroid treatment at a dosage of 6 mg once a day from the onset of hypoxia. However, the utility of PCT as a marker of infection, during COVID-19 infection and high-dose steroid therapy is potentially reduced since severe COVID-19 diseases may increase PCT levels (5) and steroid therapy may unexpectedly reduce PCT level (6), particularly by suppressing inflammation associated with COVID-19, even if bacterial superinfection occurs during the treatment. We report here about the validity of the use of PCT to diagnose bacterial superinfection during high-dose steroid therapy. A second aim of this report is to identify a PCT decision limit to more successfully diagnose the presence of a bacterial infection thus reducing antibiotic misuse.

267 consecutive hospitalized and hypoxic COVID-19 patients who received high-dose steroid therapy (Dexamethasone 6 mg/day equivalent dose steroid) have been enrolled for the study; their medical records have been examined retrospectively. The diagnosis of COVID-19 was made on the basis of a positive SARS-CoV2 nasopharyngeal swab or if the patients fulfilled three clinical criteria: high temperature ($>37.5\text{ C}^\circ$), respiratory symptoms, showing compatible chest imaging findings (7) and decreased lymphocyte count ($<1000 \times 10^9/\text{L}$) while the white blood cell count was normal or decreased. High dose steroid treatment was initiated at the onset of hypoxia and the patients received the steroid treatment according to clinical evaluation. The presence of a bacterial infection was diagnosed by an infectious disease specialist and was based on clinical, laboratory and imaging screening methods (tomography, ultrasound, magnetic resonance) as needed. All laboratory variables were obtained from hospital medical database. Demographic and disease related features of the COVID-19 patients in our cohort are shown in Table 1. The decision limits of the laboratory tests shown in Table 1 are indicated according to their relationships with severe disease (8). PCT levels were measured every other day during high-dose steroid therapy and also after the treatment if there were clinical signs of a bacterial infection. PCT concentrations were measured in serum samples by an electrochemiluminometric immuno assay within 24 hours from the blood collection using the Roche Modular E-170 analyser. The analytical sensitivity of the method is $\leq 0.02\text{ ng/mL}$; the functional sensitivity is 0.06 ng/mL . PCT concentrations are presented in Table 2. For patients without bacterial infection, the highest value during the steroid treatment has been considered; for patients diagnosed with bacterial infection the PCT value measured just before the diagnosis has been used. Since PCT values are not normally distributed, we applied the Mann-Whitney U test and Chi-square tests where appropriate. We also made the ROC curve to determine the cut-off PCT value for infection in patients. Continuous values are shown with median (IQR). $p < 0.05$ was considered significant. This study was approved by both the Local Research Ethics Committee prior to data collection and carried out in compliance with the Helsinki Declaration as amended in 2013.

17 out of 267 COVID-19 patients on high dose steroid treatment (6.4%) was diagnosed with bacterial infection (Table 2); the different sites of the infection are listed in Table 2 together with the respective PCT serum concentrations PCT levels

Corresponding Author: Mehmet Engin Tezcan, MD. (Orcid no: 0000-0002-1753-4936), Trainig and Research Hospital, Department of Rheumatology, Kartal, 34680, Istanbul-TURKEY, Tel +902164583000, E-mail engintez@yahoo.com

Ricevuto: 18.02.2021

Revisionato: 17.03.2021

Accettato: 18.03.2021

Publicato on-line: 16.04.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.020

Table 1*Demographic and disease related features of the COVID-19 patients*

| | |
|--|------------------|
| Age, years, median (IQR) | 62.0 (52.0-72.0) |
| Gender (M/F) | 159/108 |
| Positive nasopharyngeal swab, n (%) | 236 (88.4) |
| Length of steroid treatment, days (IQR) | 6.0 (5.0-8.0) |
| Time to onset of symptoms to oxygen supplementation, days, median (IQR) | 3.0 (2.0-6.0) |
| Time to hospitalization to initiation of steroid therapy, days, median (IQR) | 1.0 (1.0-1.5) |
| Disease severity (NEWS-2 score)*, median (IQR) | 3.0 (1.0-5.0) |
| Low, n (%) | 165 (62.1) |
| Moderate, n (%) | 56 (21.0) |
| High, n (%) | 45 (16.9) |
| Symptoms n (%) | |
| Cough | 174 (65.2) |
| Shortness of breath | 139 (52.1) |
| Fever | 100 (37.5) |
| Musculoskeletal | 61 (22.8) |
| Headache | 19 (7.1) |
| Sore throat | 10 (3.7) |
| Loss of taste or smell | 7 (2.6) |
| Malaise | 115 (43.1) |
| Diarrhoea | 19 (7.1) |
| Nausea/vomiting | 37 (13.9) |
| Loss of appetite | 22 (8.2) |
| Co-morbidities | |
| Charlson comorbidity index score, median (IQR) | 3.0 (1.0-5.0) |
| Diabetes mellitus, n (%) | 82 (30.7) |
| Hypertension, n (%) | 120 (44.9) |
| Coronary arterial disease, n (%) | 46 (17.2) |
| COPD, n (%) | 12 (4.5) |
| Asthma, n (%) | 19 (7.1) |
| Malignancy, n (%) | 24 (9.0) |
| Chronic renal disease, n (%) | 16 (6.0) |
| Rheumatic diseases, n (%) | 5 (1.9) |
| Clinical Chemistry** | |
| Transaminases (>35 IU/L), n (%) | 107 (40.1) |
| Creatinine (>1.2 mg/dL), n (%) | 69 (25.8) |
| LDH (>240 U/L), n (%) | 173 (64.8) |
| D-dimer (\geq 1000 ng/mL), n (%) | 112 (41.9) |
| Lymphocyte (\leq 1x10 ⁹ /L), n (%) | 133 (49.8) |
| Ferritin (\geq 300 mg/mL), n (%) | 151 (56.6) |
| CRP(>10 mg/dl), n (%) | 123 (82.0) |
| Outcome | |
| Deceased, n (%) | 18 (6.7) |
| Requirement of ICU, n (%) | 21 (7.9) |
| Requirement of MV, n (%) | 16 (6.0) |
| Length of hospitalization, days (IQR) | 7.0 (5.0-10.0) |
| Infection, n (%) | 17(6.4) |

IQR, Interquartile Range; M, Male; F, Female; COPD, Chronic obstructive pulmonary disease; ICU, Intensive care unit; MV, Mechanical ventilation; NEWS-2, National Early Warning Score-2; CRP, C reactive protein; LDH: Lactate dehydrogenase.

*At the onset of hypoxia

**The values in brackets are those related to negative outcomes (8).

Table 2*Procalcitonin levels of the COVID-19 patients with different bacterial infection types*

| | Procalcitonin (ng/mL) |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Patient without infection (n=250) | 0.09 (0.06-1.0) |
| Patient with infection (n=17) | 2.4 (0.6-14.5) |
| Pneumonia (n=10) | 2.8 (0.6-7.5) |
| Blood stream infection (n=3) | 0.8 (0.6-1.8) |
| Urinary tract infection (n=2) | 8.8 (0.7-17.0) |
| Soft tissue infection (n=2) | 27.8 (25.7-30.0) |

Data are presented as medians and InterQuartile Range.

were significantly higher in patients with infection than in patients without infection ($p < 0.001$); all patients with infection had PCT levels higher than the usually adopted decision limit (0.15 ng/mL), as expected (9). 11/17 (64.7%) of the patients were diagnosed with infection while receiving steroid therapy; the other 6 patients were diagnosed with infection after cessation of steroid therapy. The median time between the onset of steroid treatment and infection diagnosis was 7.0 (IQR 6.0-10.0) days. In addition, the median time between hospitalization and initiation of steroid therapy was 1.0 (IQR 1.0-1.5) days. 55 of 250 (22.0%) of the patients without infection had PCT levels higher than 0.15 ng/mL. According with the ROC curve, PCT higher than 0.25 ng/mL is the best cut off value for diagnosing infection in our cohort (sensitivity 94.1%, specificity 84.4 %) with a likelihood ratio of 6.03 [Confidence interval at 95% (CI 95%) 4.2.-8.4] and a negative likelihood ratio of 0.07 (CI 95% 0.01-0.47). A concentration of 0.15 ng/mL shows a similar sensitivity (94.1%) with slightly lower specificity (78.0%). Changing the decision limit of PCT from 0.15 ng/ml to 0.25 ng/ml can prevent 16 (6.4%) patients from misusing antibiotics due to increased PCT levels with the same success rate for diagnosing bacterial infections. The odds ratio for a bacterial infection diagnosis in a COVID-19 patient receiving high-dose steroids with PCT greater than 0.25 ng mL was 86.5 (CI 95% 11.1-671.7, $p < 0.001$). This large CI interval may be related to the limited sample size of the study and to the presence of outliers.

In this study where the usefulness of PCT as a bacterial infection marker in COVID-19 patients receiving high-dose steroids has been examined, more than 20% of patients without infection have PCT values above the usual cut-off (0.15 ng/mL). While PCT can still be used to diagnose bacterial infections with high sensitivity in these patients, at this value, the risk of antibiotic misuse is higher compared to setting the cut-off value to 0.25 ng/mL. The hypothesis that high dose steroid therapy could inappropriately lower PCT levels in the course of a bacterial infection in COVID-19 patients was not proved in this study. As a conclusion, the usual decision level of PCT (0.15 ng/mL) can be used in daily hospital practice to diagnose a bacterial infection while treating COVID-19 patients with high dose steroid treatment, with a slight increase of the risk of antibiotic misuse. A decision limit of 0.25 ng/mL can be used to alert clinicians of a possible bacterial infection with acceptable sensitivity and specificity, reducing the risk of antibiotic misuse, as demonstrated in a recent study (10).

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Rothan HA and Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun* 2020;109:102433.
2. Group RC, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19 - Preliminary Report. *N Engl J Med* 2021;384:693-704.
3. Noone T. An overview of steroid use and its potential side-effects. *Nurs Times* 2006;102:24-7.
4. Hamade B, Huang DT. Procalcitonin: where are we now? *Crit Care Clin* 2020;36:23-40.
5. Hu R, Han C, Pei S, et al. Procalcitonin levels in COVID-19 patients. *Int J Antimicrob Agents* 2020;56:106051.
6. Tamaki K, Kogata Y, Sugiyama D, et al. Diagnostic accuracy of serum procalcitonin concentrations for detecting systemic bacterial infection in patients with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2008;35:114-9.
7. Yang Q, Liu Q, Xu H, et al. Imaging of coronavirus disease 2019: A Chinese expert consensus statement. *Eur J Radiol* 2020;127:109008.
8. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054-62.
9. Meisner M. Update on procalcitonin measurements. *Ann Lab Med* 2014;34:263-73.
10. Peters C, Williams K, Un EA, et al. Use of procalcitonin for antibiotic stewardship in patients with COVID-19: A quality improvement project in a district general hospital. *Clin Med (Lond)* 2021;21:e71-e76.

Sistemi da sangue intero capillare per il Point of Care Testing

Soluzioni per la medicina territoriale in connettività



EMIS
Stat Data Link™
GLU KET LAC Hb/Hct

Il Futuro dell'esame
Pre-Ospedaliero



Allegro®

Un analizzatore multiparametrico
con prelievo capillare

- I test includono:
HbA1c, CREAT, PT/INR, Glu,
UACR, CRP, Lipidi

NovaNet™

Sistema completo di connettività
e gestione per Point of Care



Stat Strip®
GLUCOSIO/CHETONI

Glucosio/Chetoni POC Testing

- Nessuna interferenza clinica accertata
- L'unico glucometro certificato dalla FDA per il paziente critico



Stat Strip®
LATTATO
EMOGLOBINA/EMATOCRITO

Lattato, Hb/Hct POC Testing

- Screening e monitoraggio rapido di anemia e sepsi
- Misura sia emoglobina che ematocrito



Stat Strip®
CREATININA

Creatinina, eGFR POC Testing

- Rapida identificazione di AKI

nova
biomedical®

Contattaci per maggiori informazioni:
novabiomedical.com/it
Tel: +39 02 87071482
Email: it-info@novabio.com





CORSI FAD ECM SIBioC 2021

IL RUOLO DEL LABORATORIO NEL MANAGEMENT DEI DOAC: DOSAGGIO DEI FARMACI ED INTERAZIONE LABORATORIO-CLINICA

Benedetto Morelli, Barbara Montaruli

27 crediti ECM

AGGIORNAMENTI SULLE VARIABILI PREANALITICHE IN MEDICINA DI LABORATORIO

Graziella Bonetti, Davide Giavarina

15 crediti ECM

I DOAC: DALLA FARMACOLOGIA, ALLE INDICAZIONI CLINICHE, AL MANAGEMENT CLINICO

Benedetto Morelli, Barbara Montaruli

21 crediti ECM

AGGIORNAMENTI SULLA DIAGNOSTICA DELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI

Patrizia Natali, Giovanni Cigliana

15 crediti ECM

VARIABILITÀ BIOLOGICA

Anna Carobene

15 crediti ECM

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

riservato ai lettori di Biochimica Clinica

**Buono
sconto**

20%

sul prezzo di copertina!

€ 20,00

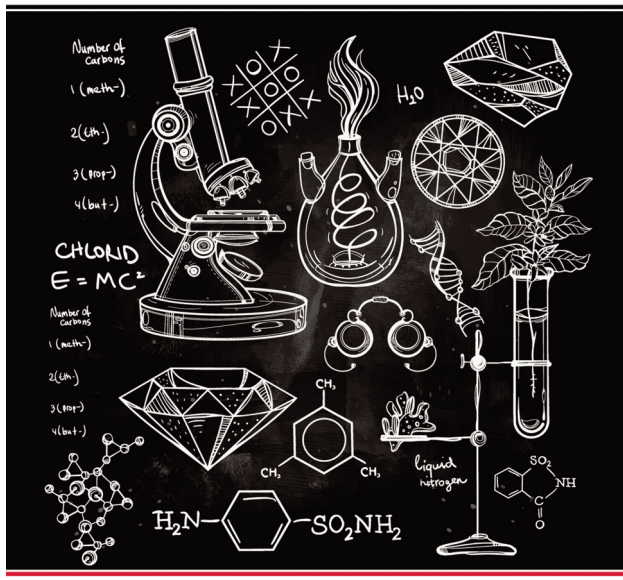
~~€ 25,00~~

Medicina di Laboratorio
SUBIOC

BC
biochimica clinica

**CASI CLINICI
IN MEDICINA
DI LABORATORIO**

A cura di
MARIA STELLA GRAZIANI e MAURO PANTEGHINI



€ 40,00

~~€ 50,00~~

BB

Biomedica Source Books

20

**Quiz, Quesiti e Casi clinici
di Medicina di Laboratorio**

A cura di
Piero Bonvicini (1945-2005),
Michele Bellenzier, Antonio Croce, Arianna De Pellegrin,
Bruno Forcina, Nunzio Toffano, Carlo Zambon

Presentazione di
Mario Plebani

BIOMEDIA
la condizione del sapere

**NONA
RISTAMPA**

...e molto altro ancora

per maggiori informazioni:

ordini@biomedia.net



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*.