
BC

biochimica clinica

In questo numero:

ETICA IN BIOLOGIA MOLECOLARE
vedi pag. 241

**DOCUMENTI SIBioC:
IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE
NELLA CHIRURGIA NON-CARDIACA**
vedi pag. 255

*SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di*

SIBioC
Medicina di Laboratorio

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

SIBioC
Medicina di Laboratorio

BIOMEDIA
La condivisione del sapere

sommario

3

EDITORIALI

186

Call for Paper numero monografico 2023

187

L'asse intestino-cervello e il ruolo del microbiota
V.D'Argenio, M.S. Graziani

RASSEGNE

190

Cannabis e Cannabinoidi naturali: focus su aspetti legislativi, clinici e di medicina di laboratorio
S. Marinelli, M.R. Vari, G. Basile

201

Microbiota intestinale e nasale nella malattia di Parkinson
F.A. Cazzaniga, A. Consonni, C.M.G. De Luca, A. Ciullini, A. Di Fonzo, F. Baggi, F. Moda

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

209

Humoral response post-BNT162b2 vaccination in baseline SARS-CoV-2 seronegative and seropositive subjects
G.L. Salvagno, B.M. Henry, L. Pighi, S. De Nitto, G. Gianfilippi, G. Lippi

213

La gestione del paziente in terapia anticoagulante orale in corso di pandemia: le soluzioni del Centro Emostasi e Trombosi di Savona
C. Scarone, V. Dovere, C. Traverso, F. Lillo

218

Shallow Whole Genome Sequencing (sWGS) pipeline for the assessment of Homologous Recombination Deficiency (HRD) score in Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) patients
G.L. Scaglione, C. Nardelli, M. Setaro, F. Russo, E.D. Capoluongo

225

Risultati preliminari per la definizione dell'intervallo di riferimento per l'indoxyl solfato (indicano) nelle urine
C. Burrini, B. Morrocchi

231

The consumption of alcohol and cocaine among the drunk-drivers: retrospective data analysis of a protocol for driving licence regranting program
P. Franceschini, G. Petriccioni, I. Mavi Sbarbaro, I. Baudone, C. Corsini, P. Bucchioni

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

Chiara Riva
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

2022-2023

Anna Carobene
Ciriaco Carru
Marcello Ciaccio
Antonio Fortunato
Giuseppe Lippi
Gavino Napolitano
Enza Pavanello
Roberta Rolla
Stefano Angelo Santini
Laura Sciacovelli *Past president*
Tommaso Trenti *Presidente*

Volume 46

Numero 3 - Settembre 2022

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Autorizzazione del
Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987



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

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



Associato all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

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.

Milano, settembre 2022

Cari Colleghi,

La diagnostica urinaria può fornire preziose informazioni in differenti contesti clinici, dalle patologie internistiche a quelle chirurgiche, dalla Medicina del Lavoro alla Tossicologia. Tuttavia, gli esami su matrice urinaria sono spesso sottoutilizzati, sia in termini di numero di richieste che di impiego ottimale delle informazioni potenzialmente ottenibili da essi.

La matrice urinaria presenta indubbi vantaggi, quali la facilità di raccolta del campione, la non invasività, la non necessità di pretrattamento del campione nella maggior parte dei casi; tuttavia, essa presenta indubbe criticità, quali la tempistica di raccolta del campione, le modalità di refertazione, la possibile adulterazione, la mancanza di intervalli di riferimento per numerosi analiti, la dipendenza dalla funzionalità renale o da farmaci assunti dal paziente. Tali criticità possono compromettere una corretta interpretazione del dato analitico, sia da parte dei laboratoristi che dei colleghi clinici. La comprensione dei limiti e delle potenzialità della matrice urinaria, e degli esami su essa eseguibili, si traduce in un miglior percorso di diagnosi e cura per il paziente.

Biochimica Clinica ritiene utile proporre un numero monografico su questa tematica, che affronti il tema sia dal punto di vista del Laboratorio che da quello Clinico, al fine di favorire un utilizzo appropriato e ottimale della diagnostica urinaria e dell'interpretazione corretta dei risultati da essa derivati.

I colleghi, con esperienze in corso nel campo specifico, sono quindi invitati a sottomettere i propri contributi, (sotto forma di Rassegne, Opinioni, Contributi originali, o Casi Clinici) per poterli condividere con la comunità scientifica italiana.

I contributi inviati saranno come sempre sottoposti all'esame da parte di revisori specializzati al fine di garantirne l'accettabilità scientifica.

Il termine per l'invio dei manoscritti è fissato entro Marzo 2023.

I Guest Editors, l'Editor in Chief e la Segreteria di Redazione sono come sempre a disposizione per ogni ulteriore chiarimento.

In attesa di ricevere i vostri contributi, inviamo i nostri più cordiali saluti

Con i più cordiali saluti,

Maria Stella Graziani
Editor in chief di Biochimica Clinica

Davide Giavarina
Matteo Vidali
Guest Editors

L'asse intestino-cervello e il ruolo del microbiota

Valeria D'Argenio^{1,2}, Maria Stella Graziani³

¹ Università Telematica San Raffaele, Roma

² CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli

³ Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

Secondo alcuni Autori, la percezione che il cervello e l'intestino partecipino ad un continuo scambio bidirezionale di segnali va fatta risalire addirittura a Ippocrate e ai filosofi greci (1), che manifestavano la convinzione che la persona dovesse essere considerata nella sua unità e non come un insieme di organi separati. Sebbene questo concetto sia stato mantenuto nel tempo e fatto proprio dai grandi della biologia più recente (Darwin e Pavlov, per fare qualche esempio), è stato solo nella prima metà del XX secolo che sono emerse le prime prove scientifiche dell'esistenza di tale connessione. Queste evidenze erano, tuttavia, deboli e limitate dalle tecniche a disposizione che non erano in grado di dimostrare con sufficiente accuratezza tale connessione. Il recente avanzamento tecnologico nell'ambito delle scienze "omiche" ha permesso di far luce su molti di questi meccanismi.

In particolare, l'impiego di tecniche di sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) ha permesso di studiare con una elevata risoluzione la composizione quali/quantitativa di un'intera comunità microbica, o microbiota (2). In questo modo, non solo è stato possibile verificare l'esistenza di un microbiota residente in diversi distretti corporei (inclusi quelli considerati sterili dalla medicina tradizionale), ma è anche emersa una significativa associazione tra una condizione di disbiosi ed un numero crescente di patologie. Queste evidenze hanno suscitato un enorme interesse all'interno della comunità scientifica, e non solo, in quanto aprono importanti prospettive in medicina traslazionale per la possibilità di identificare nuovi potenziali biomarcatori a scopo diagnostico e/o prognostico, e per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici finalizzati alla manipolazione del microbiota stesso (3-5). In tale ambito, il microbiota intestinale svolge sicuramente un ruolo chiave. Si stima, infatti, che oltre 35 000 specie batteriche risiedano nell'intestino umano dove sono responsabili di importanti e numerose funzioni fisiologiche (sviluppo dell'epitelio intestinale e dell'immunità innata, digestione di sostanze alimentari, biosintesi di vitamine e degradazione di sostanze tossiche, per citarne alcune) (6). Ne consegue che alterazioni del microbiota intestinale, compromettendo una o più di queste funzioni, possono associarsi allo sviluppo di eventi patologici di vario tipo, non solo a localizzazione intestinale ma anche in altri distretti. Da un punto di vista metodologico, le tecniche di NGS rappresentano sicuramente il metodo di elezione per lo studio del microbioma (ossia il genoma di una comunità microbica). Anche all'interno di quest'ambito, tuttavia, diversi sono gli approcci possibili, spaziando da strategie mirate (che analizzano una specifica regione genica) ad approcci molecolari più ampi, come la metagenomica "shotgun" o la metatrascrittomica (2). Anche se questi ultimi approcci non introducono bias di selezione durante la preparazione dei campioni e permettono di analizzare contemporaneamente tutte le tipologie di microorganismi (batteri, *archaea*, funghi e virus) presenti in un campione di interesse, i costi dell'indagine sono ancora elevati e la quantità di dati prodotti pone ancora importanti sfide in fase interpretativa, limitandone attualmente l'impiego su larga scala. Al contrario, l'analisi mirata in NGS del 16S rRNA (il gene che codifica per una componente del rRNA ribosomiale procariontico, tradizionalmente usato a scopi filogenetici) ha mostrato indubbi vantaggi ed è ampiamente utilizzata per lo studio del microbiota anche se questo, di fatto, limita molte delle nostre attuali conoscenze relative al ruolo del microbiota umano alla sola componente batterica. Vista la progressiva riduzione dei costi di analisi e la rapida evoluzione tecnologica, inclusi gli strumenti di analisi bioinformatica e la disponibilità di banche dati aggiornate, è auspicabile che tale limite verrà presto superato.

Tra le interessanti applicazioni per la salute umana, gli studi sul microbiota sviluppati negli ultimi anni (2) hanno evidenziato il ruolo dei microorganismi intestinali nella regolazione dell'asse intestino-cervello e hanno consentito non solo di individuare tali possibili connessioni e i meccanismi molecolari ad esse sottesi, ma soprattutto di verificare se le associazioni riscontrate fossero semplici correlazioni o fenomeni patogenetici veri e propri. L'identificazione delle possibili relazioni causali tra la presenza (o la prevalenza) di alcune specie microbiche nell'intestino umano e alcune patologie del sistema nervoso centrale (SNC) ha fatto fare un sensibile balzo in avanti alle nostre conoscenze al riguardo aprendo scenari interessanti e potenzialmente di grande utilità, anche terapeutica, per la gestione di diverse e diffuse patologie che vanno dai disturbi dello spettro autistico, alle patologie psichiatriche, ad alcune malattie

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, CEINGE Biotecnologie Avanzate, Via Gaetano Salvatore, Napoli.
Email: dargenio@ceinge.unina.it

Ricevuto: 15.07.2022

Accettato: 15.07.2022

Publicato on-line: 31.08.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.056

neurologiche come la malattia di Alzheimer, la sclerosi multipla, la sclerosi laterale amiotrofica, le malattie da prioni e la malattia di Parkinson (PD) (7-9). Tra i meccanismi causali che spiegano la connessione intestino-SNC vanno ricordati l'esistenza di un collegamento morfo-funzionale (operante nelle due direzioni) tra il sistema nervoso enterico e SNC, all'interno del quale i segnali biochimici sono veicolati dal nervo vago, la capacità di alcuni ceppi batterici intestinali di produrre proteine amiloidi, nonché di regolare la biodisponibilità di neurotrasmettitori (come la dopamina) nel SNC e nel sistema nervoso enterico.

L'interessante rassegna di Cazzaniga et al. pubblicata in questo numero di *Biochimica Clinica* (10) affronta questo affascinante argomento, considerando due aspetti specifici: il ruolo del microbiota nasale (oltre a quello più consolidato del microbiota intestinale) e la PD. Nel contributo, dopo alcuni aspetti generali dedicati al microbiota e al suo ruolo nella omeostasi dell'organismo, vengono specificatamente trattate le interazioni tra microbiota intestinale e SNC ed esaminati i possibili meccanismi attraverso i quali i due sistemi interagiscono. Più nel dettaglio viene, quindi, illustrato il possibile ruolo del microbiota nella genesi della PD. Queste evidenze, ricavate da numerosi studi sviluppatasi negli ultimi 10-15 anni, sembrano essere piuttosto robuste, anche se va sottolineato che molti studi sono stati condotti su modelli animali. In particolare, viene sottolineato il ruolo del misfolding della proteina α -sinucleina (α -sin) a formare la α -sin^D, responsabile della degenerazione neuronale che si riscontra nella PD. La causa che porta al misfolding della proteina non è tuttavia ancora stata del tutto chiarita, ma il ruolo del microbiota intestinale sembra rilevante e attuarsi attraverso almeno due distinti meccanismi. α -sin^D è stata ritrovata nel tratto gastrointestinale dei pazienti con PD ed è noto che alcuni ceppi batterici sono in grado di produrre questa proteina. Inoltre, disbiosi intestinali possono portare alla prevalenza di specie batteriche che producono tossine pro-infiammatorie, come il lipolisaccaride, in grado di indurre la formazione di α -sin^D. È stato, quindi, ipotizzato che la PD possa originare nel tratto gastrointestinale ed essere responsabile dei sintomi non motori di PD (costipazione, gastroparesi) che possono precedere di alcuni anni il manifestarsi della malattia, e venire propagata successivamente nel SNC probabilmente attraverso il nervo vago che innerva il tratto gastrointestinale. È noto peraltro che i pazienti con PD presentano disbiosi intestinali. Il ruolo del microbiota intestinale sembra, dunque, assumere sempre maggior rilievo.

La rassegna affronta, infine, un aspetto innovativo e precisamente lo studio del microbiota nasale nella PD. Gli studi al momento non sono molti e i risultati non sempre univoci. Tuttavia, alcune evidenze mostrano differenze tra il microbiota nasale dei pazienti PD rispetto ai soggetti di controllo. Considerato che α -sin^D è stata ritrovata nel bulbo olfattivo dei pazienti PD, alcuni autori avanzano l'ipotesi che α -sin^D depositandosi nei neuroni della mucosa olfattiva, possa contribuire al disturbo olfattivo, molto comune in questi pazienti, ma anche iniziare un percorso di trasporto retrogrado che le consente di migrare nel bulbo olfattivo e infine nell'encefalo, dando così origine agli aggregati di α -sin^D che si propagano poi autonomamente nel SNC.

Con tutte le cautele dovute al numero esiguo di studi disponibili e alla non univocità dei risultati ottenuti, se le disbiosi del microbiota nasale nei pazienti PD (in particolare negli stadi prodromici della malattia) dovessero venire confermate, si aprirebbero prospettive diagnostiche e terapeutiche di grande rilevanza. Da un lato il campionamento nasale è non invasivo e può, di conseguenza, essere ripetuto nel tempo per eventuali esigenze di monitoraggio, dall'altro il ripristino di una eubiosi potrebbe ritardare l'instaurarsi e la progressione della malattia. È noto infatti che gli interventi terapeutici possono mostrare dei limiti, se attuati quando la malattia si manifesta apertamente con i sintomi motori.

La rassegna di Cazzaniga et al. (10) è molto ben documentata, riporta dati recenti di estremo interesse ed esplora fenomeni patogenetici biologicamente affascinanti. Pur nella consapevolezza che questi risultati non hanno al momento riscontri nella pratica clinica e di laboratorio, crediamo che la lettura della rassegna possa essere di indubbio interesse per i lettori di *Biochimica Clinica* sia per l'innovativo campo di ricerca affrontato che per le prospettive future sia diagnostiche che terapeutiche.

Indubbiamente, affinché questi risultati possano essere traslati all'attività clinica di routine, è necessaria una standardizzazione delle procedure di analisi e l'elaborazione di linee guida che supportino la fase di interpretazione del dato di laboratorio e che, soprattutto, standardizzino la fase preanalitica. È noto che il microbiota può essere influenzato da numerosi fattori legati a caratteristiche individuali ed allo stile di vita e anche la fase di campionamento espone ad un elevato rischio di contaminazioni ambientali. Pertanto, il contributo della medicina di laboratorio sarà fondamentale per la definizione di tali aspetti.

Val la pena dunque di sottolineare ancora una volta come, anche in questa tematica, il ruolo del laboratorio clinico risulti fondamentale. In assenza della tecnologia per l'esame del microbiota e microbioma umano, queste ricerche ed i relativi risultati non sarebbero stati disponibili per la nostra comunità scientifica e per i pazienti.

Ci sembra opportuno richiamare a questo proposito quanto affermato da Schultze e Heremans in un vecchio testo (del 1966!): *"no scientist can achieve more than his technique will allow"* (11). Fin da quegli anni si era ben consapevoli che senza la disponibilità di metodi di laboratorio accurati e standardizzati, la scienza e la conoscenza non avrebbero potuto (e non potrebbero) progredire.

BIBLIOGRAFIA

1. Drossman DA, Hasler WL. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features. *Gastroenterology*

- 2016;150:1257-61.
2. Veneruso I, Tomaiuolo R, Cariati F, et al. Il microbiota umano: il buono, il brutto e il cattivo. *Biochim Clin* 2020;45:109-22.
 3. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:55-71.
 4. Armet AM, Deehan EC, O'Sullivan AF, et al. Rethinking healthy eating in light of the gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2022;30:764-85.
 5. Gibbons SM, Gurry T, Lampe JW, et al. Perspective: Leveraging the Gut Microbiota to Predict Personalized Responses to Dietary, Prebiotic, and Probiotic Interventions. *Adv Nutr* 2022:nmac075. doi: 10.1093/advances/nmac075. Epub ahead of print.
 6. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015;21:8787-803.
 7. D'Argenio V, Sarnataro D. Microbiome influence in the pathogenesis of prion and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:4704.
 8. Engelenburg HJ, Lucassen PJ, Sarafian JT, et al. Multiple sclerosis and the microbiota: progress in understanding the contribution of the gut microbiome to disease. *Evol Med Public Health* 2022;10:277-94.
 9. Eicher TP, Mohajeri MH. Overlapping mechanisms of action of brain-active bacteria and bacterial metabolites in the pathogenesis of common brain diseases. *Nutrients* 2022;14:2661.
 10. Cazzaniga FA, Consonni A, Ciara MG, et al. *Biochim Clin* 2022;46:201-8.
 11. Schultze HE, Heremans JF. *Molecular biology of human proteins*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1966.

Cannabis e cannabinoidi naturali: focus su aspetti legislativi, clinici e di medicina di laboratorio

Susanna Marinelli¹, Maria Rosaria Vari², Giuseppe Basile³

¹Dipartimento di Management and Law, Diritto dell'Economia, Università Politecnica delle Marche, Ancona

²Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

³Unità Operativa Traumatologia e Pronto Soccorso, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

ABSTRACT

Cannabis and natural cannabinoids: focus on legislative, clinical and laboratory medicine aspects.

The use of Cannabis and its derivatives is increasingly at the center of intense political debates related to regulation or prohibition. Beyond the political or ideological debates, a scientifically based information policy is however necessary to understand the differences between Cannabis used for recreational purposes, light Cannabis that can be legally sold, and Cannabis administered for therapeutic purposes, with a special focus to the analytical methods that can be utilized to differentiate the different types of Cannabis. Regarding the different properties, considered that the differentiation between the various types of Cannabis, (recreational, light or medical) is essential for legal purposes, the role played by the analytical toxicology laboratories is crucial. A number of studies with light and medical Cannabis have illustrated the possible use of Cannabidiol (CBD) as a possible biomarker to identify the type of Cannabis, since CBD is predominant in light Cannabis; the ratio of CBD to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), the only cannabinoid with psychotropic effects, has been suggested to be of particular relevance.

This review aims to analyze the current legislative, medical and laboratory medicine aspects connected to Cannabis in Italy, by focusing on the legislation currently in force and on the role of the toxicology laboratory in differentiating the different types of Cannabis.

Key words: *cannabis ricreazionale, cannabis ad uso medico, cannabis light*

INTRODUZIONE

Secondo gli studiosi, l'origine della Cannabis risale alle prime società umane agricole comprese tra il Giappone e la Cina e fu coltivata, per la prima volta, nell'estremo Oriente, nei primi secoli del Neolitico (circa 12 000 anni fa) dove la pianta era considerata una pianta multiuso, usata come fibra tessile o come pianta medicinale (1). Le prime selezioni delle varietà con lo scopo specifico di esaltare le proprietà psicotrope della pianta sarebbero, invece, iniziate all'incirca nel 2 000 aC (1). La Cannabis si diffuse in Medio Oriente, nel Mediterraneo e infine nell'Europa occidentale con le continue migrazioni delle popolazioni nomadi asiatiche (1). Nel mondo arabo, il consumo di hashish divenne consuetudinario dal 1 000 dC (2). Si cominciò a coltivarla nell'Inghilterra orientale, non solo

come pianta tessile, nel XVI secolo, ma la sua produzione commerciale si sviluppò nel XVIII secolo. Il consumo di hashish si diffuse in Occidente solo nella prima metà del XIX secolo con Napoleone, quando alcuni suoi soldati, al ritorno dalla campagna d'Egitto, la portarono con sé in Francia (3). Nel secolo scorso, la Cannabis è stata demonizzata a causa dell'alto rischio di abuso; tuttavia, le recenti politiche di decriminalizzazione e le nuove prove scientifiche del suo potenziale terapeutico hanno aumentato l'interesse medico per questa pianta.

La Cannabis è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Cannabinacee ampiamente diffusa in aree temperate e tropicali dove cresce in maniera spontanea, ma viene anche coltivata. La pianta della *Cannabis sativa* è fonte di un gran numero di principi attivi; essa produce infatti una complessa miscela di sostanze chimiche (più di 400),

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: 28.04.2022

Revisionato: 01.05.2022

Accettato: 12.05.2022

Pubblicato on-line: 01.06.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.037

70 delle quali formano il gruppo dei fitocannabinodi (4).

Il fitocannabinode principale della Cannabis è il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC, Δ^9 -THC) (Figura 1, formula 1) responsabile dell'attività psicotropa. Altri composti importanti sono il cannabidiolo (CBD) (Figura 1, formula 2), il cannabinolo (CBN) (Figura 1, formula 3), la tetraidrocannabivarina (THCV) (Figura 1, formula 4) e il cannabicromene (CBC) (Figura 1, formula 5). Il CBD non presenta effetti psicotropi, ma possiede attività ansiolitiche, antiemetiche, antidolorifiche ed è, inoltre, capace di indurre rilassamento muscolare, dimostrandosi un trattamento promettente per diverse condizioni cliniche tra cui l'epilessia, la psicosi e i disturbi d'ansia (5-7).

La Cannabis è una specie dioica, ossia le infiorescenze maschili e femminili si sviluppano in piante separate, anche se l'evoluzione della genetica botanica ha creato piante monoiche o ermafrodite (8).

La maggiore concentrazione di fitocannabinoidi si ritrova nelle estremità fiorite, mentre quantità minori si evidenziano nelle foglie, nel fusto e nelle radici. La percentuale maggiore di THC si riscontra nel materiale resinoso prodotto dai peli ghiandolari situati nei fiori delle piante femminili mentre percentuali notevolmente più basse sono presenti nelle foglie e nelle piante maschili, azzerandosi nei semi. Mentre le foglie e i gambi essiccati (Bhang) o le foglie giovani e le estremità fiorite (Ganja) presentano una bassa percentuale di Δ^9 -THC (rispettivamente 1-3% e 4-6%), la marijuana costituita dalle infiorescenze femminili essiccate ne possiede dal 5 al 10%, con percentuali fino al 30%, osservate in alcune specie di marijuana geneticamente modificata (9), mentre l'hashish (resina ottenuta dall'isolamento dei tricomi della *Cannabis sativa*) presenta una percentuale di Δ^9 -THC variabile tra il 5 e il 12%. Tuttavia, la percentuale maggiore di Δ^9 -THC (30-40% circa) è riscontrata nell'olio di hashish, una sostanza resinosa ottenuta estraendo le infiorescenze femminili con solventi organici.

CANNABIS RICREAZIONALE

La Cannabis, da cui si ricavano l'hashish, la marijuana e tutti i loro derivati, è principalmente conosciuta e utilizzata a scopo ricreativo. Molte persone la utilizzano quotidianamente per provocarsi il famoso "sballo", per condividerla con gli amici o per indurre la ricercata sensazione di rilassamento.

La marijuana corrisponde a un miscuglio di foglie e fiori secchi di colore verde-marrone, mentre l'hashish si ottiene dall'estrazione della resina, separata meccanicamente o chimicamente, dalle sommità fiorite della Cannabis femmina. Si presenta in forma solida di colore marrone. Lo spinello o "canna" è uno dei modi più comuni con cui si può consumare l'hashish oppure la marijuana (10). Quando vengono fumate, gli effetti psicoattivi delle sostanze, si avvertono nel giro di pochi minuti producendo senso di euforia, rilassamento, alterazione generale della percezione spaziale e temporale. Questo è dovuto all'interazione del THC sia con i recettori CB1, appartenenti alla famiglia dei recettori cannabinoidi accoppiati alla proteina G ed espressi prevalentemente nell'encefalo, sia con il sistema endorfinico e in particolare con i recettori oppioidi μ_1 , causando il rilascio di dopamina nel *nucleus accumbens* che genera la tipica sensazione di piacere (11). Le sensazioni stimulate possono durare dalle due alle sei ore ma variano in dipendenza dalla quantità che viene fumata e un utilizzo massiccio di queste sostanze può lasciare in uno stato di alterazione per molto tempo provocando paranoie, allucinazioni attacchi di panico e problemi psicomotori (12). Alla luce di ciò, la Convenzione sulle Sostanze Psicotrope considera il THC come una sostanza psicotropa e stupefacente sebbene le normative nei vari Stati sia a livello internazionale che europeo risultino spesso contrastanti (13).

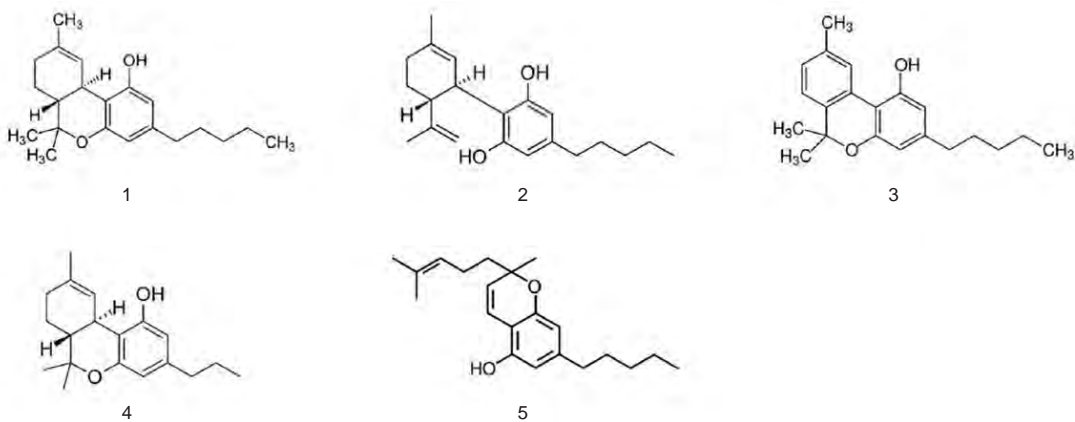


Figura 1

Struttura chimica delle molecole: 1, Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC); 2, cannabidiolo (CBD); 3, cannabinolo (CBN); 4, tetraidrocannabivarina (THCV); 5, cannabicromene (CBC)

Aspetti legislativi

Nel mondo, nel corso dell'ultimo decennio, molti Stati hanno legalizzato la Cannabis per scopo ricreativo (14). Secondo quanto riportato dall'European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), a livello della Comunità Europea non esiste una legge unica che armonizzi la produzione e il consumo di Cannabis (15). La risposta a livello penale ed amministrativo è sotto la responsabilità dei singoli Stati membri (15). In Italia, l'utilizzo della Cannabis a scopo ricreativo è regolato dal Decreto Legislativo n. 309 del 1990 e successive modifiche (meglio conosciuto come Testo Unico in Materia di Stupefacenti) (16).

La Cannabis sia in foglie sia sotto forma di olio e di resina è inclusa nella Tabella 2 allegata al Testo Unico del DPR 309/ 90 e successive modifiche mentre il principio attivo THC, con effetto psicotropo è incluso nella Tabella 1 dello stesso Decreto. Ai sensi dell'articolo 17 e 26 del Testo Unico, coltivare, produrre, fabbricare, impiegare, importare, esportare, ricevere per transito, commerciare a qualsiasi titolo o comunque detenere per il commercio sostanze stupefacenti è, in genere, vietato. L'articolo 73 del Testo Unico punisce la detenzione a fini di spaccio "chiunque senza l'autorizzazione di cui all'articolo 17, coltiva, produce, fabbrica, estrae, raffina, vende, offre o mette in vendita, cede, distribuisce, commercia, trasporta, procura ad altri, invia, passa o spedisce in transito, consegna per qualunque scopo sostanze stupefacenti o psicotrope". La violazione dell'articolo 73 è un reato e comporta un processo penale, con una condanna alla reclusione da due a sei anni nonché una multa da euro 5 164 a euro 77 468 (prevista per le droghe leggere). Esistono due casi "intermedi", pur se nell'ambito della responsabilità penale. Per il reato di spaccio, la pena è ridotta quando è ravvisabile la "lieve entità" (articolo 73 comma 5), comunemente conosciuto come "piccolo spaccio", punito con la reclusione da sei mesi a quattro anni nonché una multa da euro 1 032 a euro 10 329. Infine, ai sensi dell'articolo 131 bis del codice penale, introdotto con il Decreto Legislativo 28 del 2015 (17), se lo spaccio è considerato di particolare tenuità, per le modalità della condotta, per l'esiguità del danno o del pericolo e se il comportamento non è abituale, allora il soggetto non è punibile e nessuna sanzione penale può essere comminata.

Dal 2010 è stata introdotta nel nostro ordinamento la possibilità di sostituire la pena detentiva e pecuniaria con i lavori di pubblica utilità (LPU). Inoltre per differenziare tra il "consumo personale" che non è punibile e perseguibile per legge, e il reato di "spaccio" è stato fissato un certo quantitativo di Cannabis detenibile, che ne rappresenta il confine. Per la Cannabis in Italia, questo confine è di 500 mg di sostanza attiva ossia di THC (5 g di marijuana o hashish) (18). Anche se non può considerarsi reato, il possesso risulta come un illecito amministrativo e possono essere comminate sanzioni amministrative per un periodo variabile che riguardano la:

- sospensione della patente di guida, del certificato di abilitazione professionale per la guida di motoveicoli

- e del certificato di idoneità alla guida di ciclomotori o divieto di conseguirli per un periodo fino a tre anni;
- sospensione della licenza di porto d'armi o divieto di conseguirla;
- sospensione del passaporto e di ogni altro documento equipollente o divieto di conseguirli;
- sospensione del permesso di soggiorno per motivi di turismo o divieto di conseguirlo se cittadino extracomunitario.

Il detentore di Cannabis viene, inoltre, invitato a sottoporsi ad un programma terapeutico socio-riabilitativo predisposto dal servizio pubblico per le dipendenze patologiche del Sistema Sanitario Nazionale (Ser.D.) competente per territorio.

Tendenza d'uso

La Cannabis è la sostanza stupefacente più utilizzata all'interno dell'Unione Europea (UE), con un consumo circa cinque volte superiore a quella delle altre sostanze. Si stima che 22,2 milioni (7,2%) di adulti di età compresa tra i 15 e i 64 anni, abbiano fatto uso di Cannabis nell'ultimo anno (19) e l'1,8 % di essi, la maggior parte dei quali (61%) con meno di 35 anni, la consumi tutti i giorni o quasi ogni giorno. La Cannabis è stata "provata" almeno da 47,6 milioni di individui maschili e 30,9 milioni di individui femminili con un consumo di Cannabis nel corso della vita che passa da circa il 4% degli adulti a Malta al 45% in Francia (19). Su studenti di età compresa tra i 15 e i 16 anni, la prevalenza del consumo di Cannabis si attesta tra il 7% e il 23%, con una media ponderata del 17,3%, sebbene nel 2011 sia stata maggiore (20,4%). In Europa, solo nel 2019, circa 111 000 persone hanno richiesto un trattamento specialistico per problemi legati al consumo di Cannabis (il 35% di tutte le richieste di trattamento) di cui circa 62 000 lo hanno fatto per la prima volta (19).

In Europa sono disponibili prodotti a base di Cannabis ad alto contenuto di THC, compreso tra il 20% e il 28%, quasi il doppio di quello della Cannabis in foglie e infiorescenze (19). Per il 2020, anche in Italia, la Cannabis si è confermata la sostanza più utilizzata da tutte le tipologie di consumatori (20), sia da quelli che hanno fatto uso di una sola sostanza, sia dai cosiddetti "poliutilizzatori" con una preferenza di consumo maggiore per la marijuana (86%) rispetto all'hashish (43%) e solo per una piccola percentuale allo skunk1 (7,6%), creato negli anni '80 ibridando le varietà sativa/indica per ottenere una Cannabis molto potente. All'aumentare dell'età, cresce la percentuale di utilizzatori passando da una percentuale del 4,9% tra i 15enni al 29% tra i 19enni dove nelle fasce che corrispondono alla maggiore età (18-19enni) i ragazzi consumano più delle ragazze (20). L'età del primo utilizzo si registra tra i 15 e i 16 anni per il 55% degli studenti, almeno 17 anni per il 21%, mentre la restante quota è occupata dai 14enni (16%) o meno (7,5%) (20).

Ruolo del laboratorio

Poiché l'assunzione di Cannabis non è consentita in attività sportive professionali (doping) o può avere effetti deleteri su alcune capacità, come quella di guidare, di manovrare macchinari o di svolgere attività lavorative di particolare delicatezza e precisione, possono essere richiesti ed eseguiti accertamenti tossicologici che consentano di stabilire, anche a distanza di tempo, l'utilizzo o l'abuso di Cannabis. Per la ricerca di tale sostanza possono essere utilizzate sia tecniche immunochimiche, validate per lo screening nella matrice urinaria, che tecniche cromatografiche utilizzate per le analisi di conferma a seguito di una positività al test di screening. I test immunochimici comunemente utilizzati per lo screening utilizzano il principio di reazione antigene-anticorpo in cui le sostanze (THC e/o THC-COOH) competono con un enzima presente nel saggio. Questa tipologia di analisi è caratterizzata da tempi di esecuzione rapidi ma il risultato prodotto è esclusivamente di tipo qualitativo permettendo di stabilire la negatività o la positività di un campione. I test di screening, se positivi, richiedono l'esecuzione di test di conferma per la possibile alta percentuale di risultati falsamente positivi dovuti a classi di sostanze farmacologicamente attive che possono cross-reagire (21). I test di conferma sono più specifici dei test di screening e vengono di solito eseguiti utilizzando tecniche cromatografiche dove il valore soglia di rilevabilità è posto ad una concentrazione più bassa rispetto a quello dei saggi immunochimici. Dato che le metodologie di analisi messe a punto nei laboratori devono essere, sempre, sottoposte a verifica per la conferma della loro precisione, accuratezza e robustezza, i metodi di conferma debbono garantire l'identificazione certa e la quantificazione accurata delle sostanze di interesse (sostanze parenti e/o loro metaboliti) con idonea sensibilità e specificità.

Le tecniche devono essere in grado sia di identificare la struttura chimica dell'analita in esame che di distinguerla dai suoi metaboliti. La separazione e l'identificazione degli analiti di interesse si ottiene utilizzando metodi separativi cromatografici come la cromatografia gassosa (GC) o liquida (LC) accoppiati generalmente o ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) o a un più moderno rivelatore a spettrometria di massa (MS), che identifica i composti per il loro peso molecolare e per i frammenti tipici (22). Gli accertamenti sulla ricerca del THC o dei suoi metaboliti possono essere eseguiti su differenti matrici biologiche come urina, sangue, capelli (23) saliva e sudore (24) ma anche lavaggi bronchiali (25). I risultati possono essere influenzati, oltre che dal metabolismo dell'individuo, dal tipo di assunzione che si è fatto della sostanza, dalla quantità assunta e dalla frequenza di assunzione. Ulteriori variazioni che possono modificare il risultato dell'esame possono dipendere dalla specifica matrice biologica utilizzata, come nei campioni di saliva, che possono essere condizionati dal pH interno del cavo orale o nei campioni di urina che possono essere alterati dalla presenza di adulteranti, di acqua o di ammoniaca. L'organismo è in grado di metabolizzare il THC in differenti metaboliti inattivi, come il THC-COOH detto 11-nor-carbossi-delta-9-tetraidrocannabinolo; la sua

eliminazione avviene sia attraverso le urine (per 1/3 della dose assorbita), sia attraverso le feci (per 2/3 della dose assorbita). Si può riscontrare la presenza nelle urine di THC-COOH, già, circa 2-5 ore dopo l'assunzione e fino a 3 giorni se è stata assunta solamente una volta e fino a 30 o a 80 giorni rispettivamente in caso di consumo occasionale (una volta a settimana) o continuo. Questo tipo di tempistica è da attribuire alla cinetica della sostanza che è molto affine ai tessuti adiposi (26,27). Anche test in altre matrici biologiche, come sangue o saliva, sono in grado di rilevare il THC. Nel sangue, la presenza dei principi attivi derivanti dal consumo di Cannabis può essere rilevata per un periodo di circa 2-5 ore dall'assunzione, mentre nella saliva il tempo di rilevazione va da 1-2 fino a 12-24 ore dopo la singola assunzione. L'analisi del capello è l'unico esame in grado di rilevare i consumi di Cannabis avvenuti in un tempo pregresso. Questo tipo di analisi permette di effettuare valutazioni cronologiche a seconda della lunghezza della matrice e stabilire così lo stato di assunzione cronico, come pure comportamenti pregressi di uso/abuso di un soggetto sottoposto ad accertamento, poiché l'analisi segmentale dei capelli consente di ricostruire abbastanza fedelmente la cronologia dell'assunzione.

CANNABIS LIGHT

Recentemente sia a livello Europeo con i regolamenti 1307/2013 (28) e 2017/1155 (29) che a livello Italiano con la legge n. 242/2016 (30) è stata permessa la coltivazione di una varietà di Cannabis, definita "Cannabis light", contenente una percentuale di THC inferiore o uguale allo 0,2% (con una tolleranza fino 0,6%) e senza limiti percentuali per gli altri cannabinoidi presenti, fatta eccezione per il CBD, che può essere riportata in etichetta. Sotto la soglia di 0,2% di THC, infatti, si ritiene che il THC non possieda attività psicotropa e quindi il suo consumo non presenti controindicazioni per la salute. I prodotti, come tisane, decotti, foglie e inflorescenze essiccate in bustina (Figura 2), vengono venduti con l'indicazione specifica di "Prodotti ad uso tecnico" o "Profumatori di ambiente" e le etichette, solitamente riportano la dicitura "Non per uso umano", "Prodotto da



Figura 2
Cannabis light – I grow – confezionata in bustina

collezione” o “Raccolta erbe”. Per questi prodotti, non è in alcun modo, consentito l'utilizzo per uso medico, alimentare o come prodotti da combustione (Figura 3).

Aspetti legislativi

La base normativa, che regola la coltivazione di Cannabis light è rappresentata dalla legge 2 dicembre 2016, n. 242 (30) che consente a chiunque di coltivare la pianta esclusivamente per la produzione di fibre o per altri usi industriali, diversi dall'uso farmaceutico, con sementi certificate, individuando un ambito di tolleranza tra lo 0,2 e lo 0,6 % di concentrazione di THC, pena il sequestro e/o la distruzione del raccolto. Le varietà di canapa che possono essere coltivate, senza rientrare nell'ambito di applicazione del Testo Unico, sono quelle iscritte nel Catalogo comune delle varietà delle specie di piante agricole, ai sensi dell'articolo 17 della direttiva 2002/53/CE del Consiglio, del 13 giugno 2002 (31). Se la legge mira a regolamentare la coltivazione, non si fa, però, alcuna menzione dei fiori che “non vengono utilizzati” nella produzione per altri scopi (tessuti, cosmetici) e che vengono, oggi, commercializzati in apposite bustine, insieme a tisane e decotti, in centinaia di punti vendita specializzati, oltre che in alcuni tabaccai. La mancanza di una disciplina specifica sulla commercializzazione al dettaglio delle sostanze derivanti da tale coltivazione ha generato, nel tempo, un aspro contrasto interpretativo della normativa. Con parere del 10 aprile 2018, il Consiglio Superiore di Sanità (32) ha valutato tali prodotti come pericolosi e ha raccomandato l'adozione di misure per vietare la loro libera vendita. Successivamente, la Cassazione, con sentenza n. 4920/2019, contrariamente a quanto esposto dal Consiglio Superiore di Sanità, ha considerato il commercio della Cannabis light come una pratica lecita ma con successivo dispositivo, nella sentenza del maggio 2019 delle Sezioni Unite della Cassazione (33), la commercializzazione dei derivati della Cannabis light, quali foglie, infiorescenze, olio, resina, sono stati dichiarati non rientranti nell'ambito di applicazione della legge 242 del 2016 (30), ricadendo, così, nel reato di traffico di stupefacenti “salvo che tali derivati non fossero in concreto privi di ogni efficacia



Figura 3
Indicazioni di utilizzo della Cannabis light – I grow – confezionata in bustina

drogante o psicotropa”. Non è stato fatto alcun riferimento ai limiti percentuali di principio attivo consentiti dalla legge, né ad altri limiti quantitativi, facendo emergere, di volta in volta, la necessità di effettuare una precisa verifica sull'assenza di efficacia drogante dei prodotti commercializzati. Dato che la legislazione italiana non ha previsto, inoltre, alcun riferimento specifico e chiaro relativo al CBD, il 1 ottobre 2020 il Ministero della Salute ha emesso un decreto (34), successivamente sospeso a seguito di numerose rivendicazioni sollevate dalle associazioni di settore, con il quale includeva le “composizioni per somministrazione ad uso orale di CBD ottenuto da estratti di Cannabis” nella Tabella dei Medicinali, sezione B allegata al DPR 309/90. Ad oggi, non vi è alcuna restrizione sulla commercializzazione di prodotti contenenti CBD, grazie anche alla sentenza del 19 novembre 2020, con cui la Corte di Giustizia Europea nella causa C-663/18 (35) ha considerato, sulla base dei dati scientifici disponibili, il CBD privo di effetti psicotropi e nocivi per la salute umana, consentendo la sua commercializzazione all'interno del territorio europeo. Ad oggi, la regolamentazione sulla Cannabis light, in Italia, è in continua evoluzione.

Tendenza d'uso

Con la diffusione dei prodotti legali derivati della Cannabis light, sul territorio italiano, sono comparsi negozi al dettaglio e distributori di Cannabis light, e analogamente siti specializzati nel mercato online, in grado di garantire una privacy maggiore. Inizialmente, questi prodotti hanno interessato soprattutto chi già faceva uso di sostanze simili, rappresentando un'alternativa ‘innocua’ alla marijuana ed all'hashish. Superata la fase iniziale, il mercato ha iniziato ad attirare anche l'interesse di coloro i quali non avevano mai utilizzato sostanze di questo tipo, causando una crescita esponenziale negli acquisti durante i mesi del lockdown per la pandemia da COVID-19 e ha generato un incremento di fatturato del 76% (36). Il motivo è, probabilmente, da ricondurre all'efficacia rilassante del CBD (37).

Ruolo del laboratorio

Nel caso della Cannabis light, il laboratorio riveste un ruolo fondamentale poiché non è ancora ben chiaro quanto il consumo di questi prodotti possa comportare eventuali rischi per la salute o se il loro consumo possa evidenziare una possibile positività ai test di screening, per la presenza di THC, con possibili risvolti legali (38). In uno studio pilota condotto nel 2018 (39) che ha analizzato la saliva e le urine di 6 soggetti che avevano fumato una singola sigaretta di Cannabis light da 1 g non erano stati riscontrati risultati positivi ai test di screening relativamente alla matrice urinaria. Al contrario, nella saliva erano stati riscontrati alcuni valori positivi al test di screening iniziale dopo una sola ora dall'assunzione; tali risultati avevano pertanto richiesto la conferma in gascromatografia associata alla spettrometria di massa. Dai risultati ottenuti non era stato possibile tuttavia stabilire un uso cronico da parte di tali soggetti. A tal proposito, nel 2020, è stato condotto un secondo

studio (40) di farmacocinetica dove sono state prese in considerazione la matrice urinaria, salivare ed ematica di 12 soggetti dopo una somministrazione di Cannabis light singola o ripetuta nel tempo. Gli obiettivi di questo studio erano di valutare la concentrazione di THC e CBD nella saliva nonché nel sangue, dell'11-nor-9-carbossi-THC (THCOOH), metabolita del THC, e nell'urina di consumatori di Cannabis light che avevano fumato 1 o 4 sigarette da 1 g ed in ultimo di valutare gli effetti fisiologici e comportamentali dei partecipanti allo studio dopo l'assunzione. I risultati ottenuti hanno permesso di confermare che il fumo di 1 o 4 sigarette di Cannabis light non determinava alcuna positività ai test di screening urinari (valore soglia 50 ng/mL) o ai test di conferma per il THCOOH (valore soglia 15 ng/mL). Tuttavia nella saliva con test di screening (che presentano un valore soglia di 10 ng/mL o 5 ng/mL in funzione del kit utilizzato) si sono osservati risultati positivi al THC dopo 30 minuti e fino a 2 ore dopo il consumo, in funzione del numero di sigarette fumate. I campioni risultati positivi sono stati confermati tali al test di conferma ed in aggiunta è stato calcolato il rapporto THC/CBD. Tale valore è stato fondamentale per permettere di discriminare le tipologie utilizzabili di Cannabis rendendo tale rapporto un biomarcatore in grado di stabilire la potenza del THC nella Cannabis consumata. Infatti quando si fuma la Cannabis a scopo ricreazionale la presenza del CBD rispetto al THC è quasi trascurabile ed il rapporto THC/CBD presenta un valore >10 (41). Quando invece si fuma Cannabis light come nel caso dello studio riportato, il rapporto THC/CBD non supera mai il valore 2. Per quanto riguarda gli effetti collaterali dovuti al consumo anche ripetuto di sigarette di Cannabis light lo studio ha evidenziato, in alcuni soggetti, un aumento di sonnolenza probabilmente dovuto alla presenza del CBD che per le sue proprietà ansiolitiche ed antipsicotiche viene utilizzato nel trattamento dell'insonnia (42,43).

CANNABIS AD USO MEDICO

Nel corso degli anni, studi scientifici hanno messo in evidenza il potenziale terapeutico della Cannabis, con conseguente possibile utilizzo per scopi medici. Gli impieghi della Cannabis ad uso medico sono presenti in studi clinici controllati, studi osservazionali, nelle revisioni sistematiche e nelle metanalisi della letteratura internazionale indicizzata (37,44). In considerazione delle evidenze scientifiche fino ad ora prodotte, si può affermare che l'uso medico della Cannabis non può essere considerato una terapia propriamente detta, bensì un trattamento sintomatico di supporto ai trattamenti standard, quando questi ultimi non sono in grado di produrre gli effetti desiderati, o hanno provocato effetti secondari non tollerabili, o necessitano di incrementi posologici che potrebbero determinare la comparsa di effetti collaterali. L'uso medico della Cannabis presenta tuttavia alcune criticità riguardanti il non elevato numero di studi clinici a disposizione su efficacia e sicurezza e una produzione nazionale ad oggi insufficiente a soddisfare la crescente domanda. Esiste inoltre una difficoltà interpretativa della normativa vigente ed una difformità a livello regionale

nell'applicazione delle disposizioni ministeriali in materia anche relativamente ad aspetti quali la conduzione dei veicoli e le mansioni lavorative a rischio (45). Le ulteriori criticità rilevate sono: la mancanza di standardizzazione dei preparati galenici a base di Cannabis (46), la scarsa o poco partecipata formazione del personale sanitario in materia, il coinvolgimento dei pazienti, la conoscenza e lo sviluppo di strategie di prevenzione e identificazione precoce delle forme di dipendenza da Cannabis ad uso medico. Infine, ma non di minore importanza, è da segnalare la scarsa attenzione verso altri farmaci antidolorifici, che mostrano un alto potenziale additivo e che hanno causato in altri Paesi, ad esempio gli Stati Uniti, notevoli problemi di salute pubblica. A tal proposito gli organi deputati al controllo della produzione ed utilizzo della Cannabis ad uso medico sono al lavoro per trovare possibili soluzioni che mirino alla risoluzione delle criticità sopra evidenziate.

Aspetti legislativi

In Italia, fino al 2006, l'acquisto e l'utilizzo dei farmaci a base di Cannabis era permesso, solo grazie alla procedura prevista dal decreto ministeriale 11 febbraio 1997 che consentiva le importazioni di specialità medicinali registrate all'estero (47). Con l'approvazione della legge Fini-Giovanardi (48), l'importazione di questi farmaci è stata vietata e la Cannabis e i suoi derivati sono stati classificati come sostanze d'abuso prive di utilità terapeutica fino al D.M. 18.04.2007 (49) che ha trasferito, nuovamente, i principi attivi della Cannabis, di sintesi o naturali (delta-9-tetraidrocannabinolo, transdelta-9-tetraidrocannabinolo, dronabinol e nabilone) dalla Tabella 1 alla Tabella 2 del D.P.R. 309/90. Successivamente, con il Decreto Ministeriale 23.01.2013 (50), anche i medicinali di origine vegetale, compresi estratti e tinte furono inclusi in Tabella 2 del D.P.R. 309/90, fino al 2014, quando fu creata una Tabella dedicata per la Cannabis con il conseguente inserimento dei prodotti ottenuti dalla stessa e delle relative preparazioni nella nuova Tabella dei Medicinali, sezione B, del D.P.R. 309/90 grazie al decreto legge 20.03.2014, n.36, convertito con legge 16.05.2014, n. 79 (51). Attualmente la normativa di riferimento che regola l'uso e la somministrazione della Cannabis ad uso medico è rappresentata dal Decreto Ministeriale del 9 novembre 2015 (52). Con questo decreto, il Ministero della Salute ha autorizzato la coltivazione delle piante di Cannabis da utilizzare per la produzione di medicinali di origine vegetale a base di Cannabis individuando a tal proposito le aree da destinare alla coltivazione di tali piante e la superficie dei terreni su cui la coltivazione è consentita. In conformità a quanto previsto dall'accordo di collaborazione tra il Ministro della Salute ed il Ministro della Difesa firmato in data 18 settembre 2014, il Ministero della Salute ha individuato quale sito di produzione l'Agenzia Industrie Difesa - Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare di Firenze (AID-SCFM), che pertanto al momento coltiva e produce la "sostanza attiva in conformità all'Active Substance Master File (ASMF) depositato all'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)". Attualmente, sono due le sostanze

prodotte nello Stabilimento di Firenze, ossia la Cannabis FM2, contenente tra il 5 e l'8% di THC nonché tra il 7,5 e il 12% di CBD, e la Cannabis FM1, che contiene tra il 13 e il 20% di THC e meno dell'1% di CBD (Tabella 1). Il Decreto Ministeriale (52), disciplina inoltre le modalità di prescrizione da parte dei medici, di "preparazioni magistrali" a base di Cannabis, di prodotti importati, per la maggior parte dall'Olanda (Tabella 1), dato che ad oggi, in Italia, solo il Sativex, medicinale di origine industriale ha ottenuto l'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC), in classe H. Il DM ha dato luogo, inoltre, alla creazione di un sistema di fitosorveglianza per il monitoraggio della sicurezza effettuato attraverso la raccolta delle segnalazioni di sospette reazioni avverse associate alla somministrazione delle preparazioni magistrali a base di Cannabis (52).

Uso clinico

L'impiego della Cannabis ad uso medico è consentito per le seguenti patologie:

- l'analgesia in patologie che implicano spasticità associata a dolore (sclerosi multipla, lesioni del midollo spinale) resistente alle terapie convenzionali (53);
- l'analgesia nel dolore cronico (con particolare riferimento al dolore neurogeno) in cui il trattamento con antinfiammatori non steroidei o con farmaci cortisonici o oppioidi si sia rivelato inefficace (54);
- l'effetto anticinetosico ed antiemetico, nella nausea e vomito, causati da chemioterapia, radioterapia, terapie per HIV, che non può essere ottenuto con trattamenti tradizionali (55);
- l'effetto stimolante dell'appetito nella cachessia, anoressia, perdita dell'appetito in pazienti oncologici o affetti da AIDS e nell'anoressia nervosa, che non può essere ottenuto con trattamenti standard (56);

Tabella 1

Prodotti medicinali a base di Cannabis disponibili in Italia

Varietà	Contenuto infiorescenza		Provenienza
	THC	CBD	
FM1	13-20%	<1%	Italia
FM2	5-8%	7,5-12%	
BEDROCAN	≈22%	<1%	Olanda
BEDROBINOL	≈12%	<1%	
BEDIOL	≈6,5%	≈8%	
BEDICA	≈14%	<1%	
BEDIOLITE	<1%	≈9%	
PEDANIOS 22/1	≈22%	<1%	Canada
PEDANIOS 8	≈8%	≈8%	
PEDANIOS 1/8	<1%	≈9%	

THC, (6aR,10aR)-6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,10a-tetraidro-6H-benzo[c]cromen-1-olo;

CBD, 2-[(1R6R)-6-isopropenil-3-metilcicloes-2-en-1-il]-5-pentilbenzen-1,3-diolo

- l'effetto ipotensivo nel glaucoma resistente alle terapie convenzionali (57);
- la riduzione dei movimenti involontari del corpo e facciali nella sindrome di Tourette che non può essere ottenuta con trattamenti standard (58).

È importante sottolineare che nel caso dell'uso medico della Cannabis, la via di somministrazione e le dosi da utilizzare sono a discrezione del medico curante, tenuto conto delle esigenze terapeutiche del paziente. Inoltre per assicurare la continuità terapeutica per ogni paziente in trattamento, è possibile utilizzare le preparazioni messe a disposizione con due diverse modalità di assunzione: per via orale (decocto o olio) o per via inalatoria tramite vaporizzatore (Figura 4).

Con la somministrazione orale gli effetti fisiologici sono più lenti nel comparire ma perdurano maggiormente nel tempo mentre con la somministrazione inalatoria gli effetti sono più rapidi ma di minor durata nel tempo. In entrambi i casi, è consigliabile iniziare da dosaggi minimi su indicazione del medico, per poi eventualmente regolare tali dosaggi in funzione sia dell'effetto farmacologico che di eventuali effetti collaterali avversi.

A tal proposito, il medico curante deve sempre tenere conto del rapporto rischio/beneficio nell'uso medico della Cannabis considerando che la Cannabis può indurre dipendenza complessa, può provocare un danno cognitivo di memoria, cambiamenti di umore e percezioni alterate.

Ruolo del laboratorio

La determinazione quali-quantitativa dei due principali cannabinoidi, THC e CBD nelle preparazioni galeniche destinate ai pazienti eseguita presso i laboratori di farmaco-tossicologia analitica è un passaggio importante ed obbligato per assicurare la qualità del prodotto da somministrare. Infatti, pur partendo dalla stessa identica materia prima è possibile ottenere preparazioni con un contenuto diverso di



Figura 4
Vaporizzatore "Volcano"

cannabinoidi a seconda della metodica utilizzata per ottenere gli estratti, da completamente decarbossilati, in cui non sono presenti né componenti acidi [ad esempio acido tetraidrocannabinolico (THCA)] né terpeni come nella metodica Pacifici et al. (59), a completamente non decarbossilati, in cui sono presenti solo precursori acidi (THCA) e terpeni come nella metodica Romano et al. (60) oppure ad estratti parzialmente decarbossilati, contenenti sia THC che THCA insieme ai terpeni come nella metodica Cannazza et al. (61) (Tabella 2).

Il farmacista preparatore deve, dunque effettuare *“la titolazione del/i principio/i attivo/i per ciascuna preparazione magistrale con metodologie sensibili e specifiche quali la cromatografia liquida o gassosa accoppiate alla spettrometria di massa, ovvero, il metodo di estrazione debba essere autorizzato ai sensi della normativa vigente”* (52). Al fine di garantire un prodotto da somministrare in sicurezza sono stati condotti studi di stabilità dei fitocannabinoidi presenti nelle infiorescenze a contenuto standardizzato prodotte dallo Stabilimento di Firenze, nonché sulle preparazioni acquose (decotti) e preparazioni oleose ottenute dalle infiorescenze stesse (59,62,63). Questi studi condotti a breve, medio e lungo termine a due diverse temperature di conservazione hanno evidenziato che mentre i fitocannabinoidi presenti nel decotto hanno una stabilità media di 3 giorni a temperatura ambiente e a 4°C (59), nei prodotti di natura oleosa, dopo un iniziale decremento nella concentrazione di alcuni fitocannabinoidi (fino ad un massimo del 25%) non significativo a fini terapeutici, questi rimangono stabili nel tempo indipendentemente dalla temperatura di conservazione. A livello clinico è stato effettuato uno studio per valutare gli effetti fisiologici, soggettivi e sulla cinetica dei fitocannabinoidi in 13 soggetti sani a cui sono stati somministrati il decotto e l'olio di Cannabis a concentrazioni note di principi attivi (64,65); lo studio ha evidenziando un'elevata variabilità interindividuale

nell'assorbimento dei fitocannabinoidi con un miglior assorbimento del preparato acquoso rispetto al preparato oleoso sebbene il decotto presentasse una minor concentrazione di fitocannabinodi. La stessa Cannabis ad uso medico somministrata con un vaporizzatore in volontari sani ha dimostrato una biodisponibilità più veloce e una maggiore concentrazione di principi attivi (66). Questi studi hanno permesso quindi di standardizzare le metodologie analitiche per l'analisi dei preparati galenici dando anche informazioni relative alla farmacocinetica dei prodotti al fine di ridurre al massimo i possibili effetti collaterali associati all'utilizzo dei preparati a base di Cannabis.

CONCLUSIONI

La Cannabis rimane di gran lunga la sostanza stupefacente universalmente più utilizzata. A tal proposito però risulta fondamentale la distinzione tra le diverse tipologie di Cannabis. Alla luce degli studi effettuati questa distinzione, importante anche da un punto di vista medico-legale, può essere effettuata considerando la quantità di CBD, che ricordiamo essere il principio attivo non psicotropo, presente nei diversi preparati. Mentre possiamo dire che nella Cannabis utilizzata a scopo ricreazionale tale principio è quasi assente rispetto alla presenza del THC con rapporto THC/CBD sempre >10, nei preparati light e nei preparati a scopo medico non è così. Si può affermare infatti che nei prodotti venduti come Cannabis light nei negozi o tramite i canali web, la quantità del CBD risulta sempre più alta di quella del THC che è presente allo 0,2%. Inoltre le analisi di laboratorio permettono di affermare che il rapporto di concentrazioni fra THC/CBD nei diversi liquidi biologici relativo al consumo di questi prodotti è ≤2. Per i prodotti utilizzati a scopo medico la presenza dei due principi attivi è ovviamente standardizzata e regolamentata dal

Tabella 2
Metodiche standardizzate per la preparazione di estratti a base di Cannabis

Preparazioni di Cannabis	
Cannabis Decarbossilata	Cannabis non decarbossilata
<p>SIFAP (Società Italiana Farmacisti Preparatori)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Porre in contenitore di vetro chiuso le infiorescenze sminuzzate. - Stufa a secco a 115°C per 40 min e successivamente lasciar raffreddare con contenitore chiuso. - Porre in olio mescolando con opportune strumentazioni. - Scaldare a b.m. a 100°C per 40 min con agitazione continua. - Recuperare l'olio ancora caldo dopo filtrazione. - Aggiungere α-tocoferolo 0,05% V/V e agitare. 	<p>Cannazza et al. (61)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Olio e estrazione con ricadere. - Alla Cannabis finemente macinata aggiungere olio di oliva in un pallone munito di ricadere. - Sotto agitazione magnetica, scaldare a 110°C a refluxo per 2 ore. - Per almeno 2 ore, raffreddare a temperatura ambiente. - Filtrare con filtro di carta.
<p>Pacifici et al. (59)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Porre in stufa preriscaldata a 145°C per 30 min o 115° per 40 min un becher con Cannabis sminuzzata e ricorpetto di stagnola. - Raffreddare il contenitore coperto. - Porre nell'olio d'oliva, scaldando a b.m. (~98°C) per 120 min. - Filtrare pressando il materiale vegetale. 	<p>Romano</p> <ul style="list-style-type: none"> - Porre la Cannabis sminuzzata nell'olio d'oliva in un contenitore di vetro. - Scaldare a bagnomaria (~98°C) per 120 min. - Lasciar raffreddare. - Filtrare pressando il materiale vegetale. - Raccogliere l'olio.

Decreto Ministeriale del 9 novembre 2015 dove altresì si riportano le regole per la dispensazione di tali prodotti che deve avvenire, sempre, con prescrizione medica da rinnovarsi volta per volta. Inoltre, il consumo deve essere effettuato sotto stretto controllo medico per valutare in maniera attenta, il dosaggio della sostanza utile nel caso specifico, tenendo conto anche delle aree problematiche correlabili ad un eventuale rischio di dipendenza complessa da Cannabis nel soggetto. Pertanto, ancora una volta si richiama l'importanza del ruolo del laboratorio nella definizione e nella gestione delle problematiche presentate e discusse in questa rassegna.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessun conflitto.

BIBLIOGRAFIA

- Ren G, Zhang X, Li Y, et al. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Sci Adv* 2021;7:eabg2286.
- Siagura E. Parkinson e *Cannabis*, nuovi orizzonti. <https://www.laboratorio-galenico.it/2017/02/07/cannabis-e-morbo-di-parkinson-nuovi-orizzonti/> (ultimo accesso: maggio 2022).
- Luty J. The beginning of the end of prohibition: the politics of drug addiction. *BJPsych Advances* 2016;22:242-50.
- EIshohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids *Life Sci* 2005;78:539-48.
- Bergamaschi MM, Costa Queiroz RH, Waldo Zuari A, et al. Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent. *Curr Drug Saf* 2011;6:237-49.
- Devinsky O, Cross JH, Laux L, et al. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N Engl J Med* 2017;376:2011-20.
- McGuire P, Robson P, Cubala WJ, et al. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry* 2018;175:225-31.
- Serpelloni G. Varianti delle piante di cannabis e danni alla salute. Rassegna iconografica sulle nuove tipologie di cannabis e delle modalità di coltivazione intensiva. Presidenza del Consiglio dei Ministri – Dipartimento Politiche Antidroga. Aprile 2014, 1-190. https://www.politicheantidroga.gov.it/media/1481/manuale_iconografico_cannabis_bassa.pdf (ultimo accesso: maggio 2022).
- Zamengo L, Frison G, Bettin C, et al. *Cannabis* potency in the Venice area (Italy): update 2013. *Drug Test Anal* 2015;7:255-8.
- Hindocha C, Freeman TP, Ferris JA, et al. No Smoke without Tobacco: A Global Overview of *Cannabis* and Tobacco Routes of Administration and Their Association with Intention to Quit. *Front Psychiatry* 2016;7:104.
- Delta-9-tetraidrocannabinolo. Wikipedia. <https://it.wikipedia.org/wiki/Delta-9-tetraidrocannabinolo> (ultimo accesso: maggio 2022).
- Maremmani I, Lazzeri A, Canoniero S. Abuso di sostanze e psicosi croniche. Substance abuse and chronic psychoses. *J Psychopathol* 1999;5.
- Legalità della Cannabis. Wikipedia https://it.wikipedia.org/wiki/Legalità_della_cannabis (ultimo accesso: maggio 2022).
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Cannabis policy hub. https://www.emcdda.europa.eu/topics/cannabis-policy_en (ultimo accesso: aprile 2022).
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Cannabis legislation in Europe: an overview Lisbon 2017. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4135/TD0217210ENN.pdf> (ultimo accesso: aprile 2022).
- Testo Unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 255 del 31 ottobre 1990 – Suppl. Ordinario n. 67. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1990/10/31/090G0363/sg> (ultimo accesso: aprile 2022).
- Decreto Legislativo 16 marzo 2015, n. 28. Gazzetta ufficiale della Repubblica n. 64 del 18 marzo 2015. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/gu/2015/03/18/64/sg/pdf> (ultimo accesso: maggio 2022).
- Indicazione dei limiti quantitativi massimi delle sostanze stupefacenti e psicotrope, riferibili ad un uso esclusivamente personale delle sostanze elencate nella tabella 1 del Testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e delle sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, come modificato dalla legge 21 febbraio 2006, n. 49, ai sensi dell'articolo 73, comma 1-bis. Decreto Ministeriale 11 aprile 2006 - Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 95 del 24 aprile 2006. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2006/04/24/06A04031/sg> (ultimo accesso: aprile 2022).
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). European Drug Report 2021: Trends and Developments. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13838/TDAT21001ENN.pdf> (ultimo accesso: aprile 2022).
- Relazione Annuale al Parlamento sul Fenomeno delle Tossicodipendenze in Italia – Anno 2021 (Dati 2020). Presidenza del Consiglio dei Ministri – Dipartimento per le Politiche Antidroga. <https://www.politicheantidroga.gov.it/media/3076/rap2021pdf.pdf> (ultimo accesso: maggio 2022).
- Test Tossicologici. <https://labtestsonline.it/tests/test-tossicologici> (ultimo accesso: maggio 2022).
- Carlier J, Huestis MA, Zaami S, et al. Monitoring perinatal exposure to *cannabis* and synthetic cannabinoids. *Ther Drug Monit* 2020;42:194-204.
- Musshoff F, Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit* 2006;28:155-63.
- Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. *J Anal Toxicol* 2000;24:557-61.
- Rotolo MC, Pellegrini M, Martucci P, et al. Cannabinoids determination in bronchoalveolar lavages of cannabis smokers with lung disease. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:498-503.
- Bonn-Miller MO, Loflin MJE, Thomas BF, et al. Labeling accuracy of cannabidiol extracts sold online. *JAMA* 2017;318:1708-9.
- Pavlovic R, Nenna G, Calvi L, et al. Quality traits of “cannabidiol oils”: cannabinoids content, terpene fingerprint and oxidation stability of european commercially available preparations. *Molecules* 2018; 23:1230.
- Regulation (EU) No 1307/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 establishing rules for direct payments to farmers under support schemes within the framework of the common agricultural policy and repealing Council Regulation (EC) No 637/2008 and Council Regulation (EC) No 73/2009. <https://eur-lex.europa.eu/>

- legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1307&from=en (ultimo accesso: aprile 2022).
29. Commission Delegated Regulation (EU) 2017/1155 of 15 February 2017 amending Delegated Regulation (EU) No 639/2014 as regards the control measures relating to the cultivation of hemp, certain provisions on the greening payment, the payment for young farmers in control of a legal person, the calculation of the per unit amount in the framework of voluntary coupled support, the fractions of payment entitlements and certain notification requirements relating to the single area payment scheme and the voluntary coupled support, and amending Annex X to Regulation (EU) No 1307/2013 of the European Parliament and of the Council. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1155&from=EN> (ultimo accesso: aprile 2022).
 30. Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa. Legge 2 dicembre 2016, n. 242 - Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 304 del 30 dicembre 2016. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/12/30/16G00258/sg> (ultimo accesso: aprile 2022).
 31. Direttiva 2002/53/CE del Consiglio, del 13 giugno 2002, relativa al catalogo comune delle varietà delle specie di piante agricole. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02002L0053-20040418&from=PL> (ultimo accesso: aprile 2022).
 32. Consiglio Superiore di Sanità – Sezione V - Seduta del 10 aprile 2018. Parere sulla commercializzazione di prodotti contenenti THC. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2761_allegato.pdf (ultimo accesso: aprile 2022).
 33. Corte Suprema di Cassazione - Sezioni Unite Penali: sentenza in materia di cannabis sativa L (30 maggio 2019). <https://www.cortedicassazione.it/cassazione-resources/resources/cms/documents/cannabis.pdf> (ultimo accesso: maggio 2022).
 34. Aggiornamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, e successive modificazioni ed integrazioni. Inserimento nella tabella dei medicinali, sezione B, delle composizioni per somministrazione ad uso orale di cannabidiolo ottenuto da estratti di Cannabis. Ministero della Salute - Decreto 1 ottobre 2020, Gazzetta Ufficiale n.255 del 15-10-2020. https://images.go.wolterskluwer.com/Web/WoltersKluwer/%7B0b30225e-53b8-49f0-b990-81c-c9af8f730%7D_ministero-salute-decreto-1-ottobre-2020-cannabidiolo-cannabis.pdf?_gl=1%2A1flax14%2A_ga%2AMTM4MTYyMzI1My4xNjUxNTA0NTQ0%2A_ga_B95LYZ7CD4%2AMTY1MTUwNDU0Mi4xLjAuMTY1MTUwNDU0Mi4w (ultimo accesso: maggio 2022).
 35. Corte di Giustizia Europea (Quarta Sezione) 19 novembre 2020. «Rinvio pregiudiziale – Libera circolazione delle merci – Organizzazione comune dei mercati nel settore del lino e della canapa – Deroghe – Tutela della salute – Legislazione nazionale che limita l'industrializzazione e la commercializzazione della canapa soltanto alle fibre e ai semi – Cannabidiolo (CBD)». <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/HTML/?uri=CELEX:62018CJ0663&from=IT> (ultimo accesso: maggio 2022).
 36. Le migliori varietà di Cannabis Light del 2022. <https://www.dolcevitaaonline.it/migliori-variet%C3%A0-cannabis-light-2022/> (ultimo accesso: maggio 2022).
 37. Montero-Oleas N, Arevalo-Rodriguez I, Nuñez-González S, et al. Therapeutic use of cannabis and cannabinoids: an evidence mapping and appraisal of systematic reviews. *BMC Complement Med Ther* 2020;20:12.
 38. 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.
 39. Pichini S, Mannocchi G, Berretta P, et al. Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol time courses in the sera of "light cannabis" smokers: discriminating light cannabis use from illegal and medical cannabis use. *Ther Drug Monit* 2020;42:151-6.
 40. Pacifici R, Pichini S, Pellegrini M, et al. THC and CBD concentrations in blood, oral fluid and urine following a single and repeated administration of "light cannabis". *Clin Chem Lab Med* 2020;58:682-9.
 41. Lee D, Vandrey R, Milman G, et al. Oral fluid/plasma cannabinoid ratios following controlled oral THC and smoked cannabis administration. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:7269-79.
 42. Babson KA, Sottile J, Morabito D. Cannabis, cannabinoids, and sleep: a review of the literature. *Curr Psychiatry Rep* 2017;19:23.
 43. Brunetti P, Lo Faro AF, Pirani F, et al. Pharmacology and legal status of cannabidiol. *Ann Ist Super Sanità* 2020;56:285-91.
 44. Kosiba JD, Maisto SA, Ditre JW. Patient-reported use of medical cannabis for pain, anxiety, and depression symptoms: Systematic review and meta-analysis. *Soc Sci Med* 2019;233:181-92.
 45. Zaami S, Di Luca A, Di Luca NM, et al. Medical use of cannabis: Italian and European legislation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:1161-7.
 46. Cangemi G, Bucchioni P, Tripodi G, et al. Titolazioni dei preparati galenici oleosi a base di cannabis in Regione Liguria: progetto sperimentale dei laboratori di riferimento regionale. *Biochim Clin* 2020;44:367-3.
 47. Modalità di importazione di specialità medicinali registrate all'estero. Decreto Ministeriale 11 febbraio 1997 – Gazzetta Ufficiale n. 72 del 27 marzo 1997. <https://antidroga.interno.gov.it/wp-content/uploads/2019/04/D.M.-11-febbraio-1997.pdf> (ultimo accesso: aprile 2022).
 48. Conversione in legge, con modificazioni del decreto-legge 30 dicembre 2005, n. 272, recante misure urgenti per garantire la sicurezza ed i finanziamenti per le prossime Olimpiadi invernali, nonche' la funzionalita' dell'Amministrazione dell'interno. Disposizioni per favorire il recupero di tossicodipendenti recidivi. Legge 21 febbraio 2006, n. 49 – Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.48 del 27-02-2006 - Suppl. Ordinario n. 45. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2006/02/27/006G0053/sg> (ultimo accesso: maggio 2022).
 49. Aggiornamento e completamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope e relative composizioni medicinali, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, e successive modificazioni ed integrazioni, recante il testo unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope e di prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza. Decreto 18 aprile 2007 – Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 98 del 28 aprile 2007 <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=23064> (ultimo accesso: maggio 2022).
 50. Aggiornamento delle tabelle contenenti l'indicazione delle sostanze stupefacenti e psicotrope, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309 e successive modificazioni ed integrazioni. Inserimento nella Tabella 2, Sezione B, dei medicinali di origine vegetale a base di Cannabis (sostanze e preparazioni vegetali, inclusi estratti e tinte). Decreto 23 gennaio 2013 – Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 33 del 08 febbraio 2013

- <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=45210> (ultimo accesso: maggio 2022).
51. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 20 marzo 2014, n. 36, recante disposizioni urgenti in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309, nonché di impiego di medicinali meno onerosi da parte del Servizio sanitario nazionale. Legge 16 maggio 2014, n. 79 – Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.115 del 20 maggio 2014 <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2014/05/20/14G00090/sg> (ultimo accesso: maggio 2022).
 52. Decreto 9 novembre 2015: Funzioni di Organismo statale per la cannabis previsto dagli articoli 23 e 28 della convenzione unica sugli stupefacenti del 1961, come modificata nel 1972. Decreto 9 novembre 2015 – Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.279 del 30-11-2015. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/11/30/15A08888/sg> (ultimo accesso: aprile 2022).
 53. Giacoppo S, Mandolino G, Galuppo M, et al. Cannabinoids: new promising agents in the treatment of neurological diseases. *Molecules* 2014;19:18781-816.
 54. Brunetti P, Pichini S, Pacifici R, et al. Herbal Preparations of Medical Cannabis: A Vademecum for Prescribing Doctors. *Medicina (Kaunas)* 2020;56:237.
 55. Smith LA, Azariah F, Lavender VT, et al. Cannabinoids for nausea and vomiting in cancer patients receiving chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;11:CD009464.
 56. Haney M, Gunderson EW, Rabkin J, et al. Dronabinol and marijuana in HIV-positive marijuana smokers. Caloric intake, mood, and sleep. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:545-54.
 57. Tomida I, Azuara-Blanco A, House H, et al. Effect of sublingual application of cannabinoids on intraocular pressure: a pilot study. *J Glaucoma* 2006;15:349-53.
 58. Müller-Vahl KR. Treatment of Tourette syndrome with cannabinoids. *Behav Neurol* 2013;27:119-24.
 59. Pacifici R, Marchei E, Salvatore F, et al. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1555-63.
 60. Romano LL, Hazekamp A. Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids* 2013;1:1-11.
 61. Citti C, Ciccarella G, Braghiroli D, et al. Medicinal cannabis: principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *J Pharm Biomed Anal* 2016;128:201-9.
 62. Pacifici R, Marchei E, Salvatore F, et al. Evaluation of long-term stability of cannabinoids in standardized preparations of cannabis flowering tops and cannabis oil by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:94-6.
 63. Pacifici R, Marchei E, Salvatore F, et al. Stability of cannabinoids in cannabis FM1 flowering tops and oil preparation evaluated by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:e165-8.
 64. Pérez-Acevedo AP, Pacifici R, Mannocchi G, et al. Disposition of cannabinoids and their metabolites in serum, oral fluid, sweat patch and urine from healthy individuals treated with pharmaceutical preparations of medical cannabis. *Phytother Res* 2021;35:1646-57.
 65. Pérez-Acevedo AP, Busardò FP, Pacifici R, et al. Disposition of cannabidiol metabolites in serum and urine from healthy individuals treated with pharmaceutical preparations of medical cannabis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020;13:459.
 66. Busardò FP, Pérez-Acevedo AP, Pacifici R, et al. Disposition of phytocannabinoids, their acidic precursors and their metabolites in biological matrices of healthy individuals treated with vaporized medical cannabis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14:59.

Microbiota intestinale e nasale nella malattia di Parkinson

Federico Angelo Cazzaniga¹, Alessandra Consonni², Chiara Maria Giulia De Luca¹, Arianna Ciullini¹, Alessio Di Fonzo³, Fulvio Baggi², Fabio Moda¹

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

²Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Unità di Neurologia 4 - Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Milano, Italia

³Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Unità di Neurologia, Milano, Italia

ABSTRACT

Gut and nasal microbiota in Parkinson's disease.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition characterized by a series of symptoms that anticipate overt disease. In particular, rapid eye movement (REM) sleep behavior disorders, intestinal problems and olfactory impairment are the most frequent prodromal signs of the disease. Compelling evidence suggests that, among other factors, the microbiota might play an important role in the onset and progression of PD. While several findings confirmed that there might be an important link between intestinal microbiota alterations and PD onset, little is known about the potential contribution of the nasal microbiota. Here, we will describe the latest findings on this topic by considering that more than 80% of patients with PD develop remarkable olfactory deficits in their prodromal disease stage. Therefore, the nasal microbiota might contribute to PD, eventually boosting the intestinal microbiota in promoting disease onset.

Parole chiave: malattia di Parkinson, microbiota nasale, α -sinucleina

INTRODUZIONE

Gli ecosistemi microbici umani che comprendono batteri, *archaea*, eucarioti e virus colonizzano diversi habitat del corpo tra cui la pelle, il tratto urogenitale, gastrointestinale e respiratorio. Il termine microbiota definisce la complessa popolazione di microrganismi localizzati in specifiche nicchie ecologiche, mentre l'intero patrimonio genetico viene definito microbioma; sebbene i due termini abbiano significati diversi, microbiota e microbioma vengono spesso usati in modo intercambiabile dalla comunità scientifica. Grazie a metodologie avanzate di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) (1) è oggi possibile isolare e sequenziare, con relativa facilità, il DNA di comunità microbiche specifiche presenti in un determinato tessuto.

In particolare, il sequenziamento del gene 16S rRNA, che codifica per la subunità 16S (componente della subunità 30S di un ribosoma procariotico), permette di identificare, classificare e quantificare le diverse specie batteriche. Il gene 16S rRNA è altamente conservato, ma contiene nove regioni ipervariabili (V1-V9) che fungono da impronte digitali per le diverse specie. Il grado di conservazione varia ampiamente tra le regioni ipervariabili, con regioni più conservate correlate a tassonomia di livello superiore e regioni meno conservate a livelli inferiori, come genere e specie. Per questo motivo, utilizzando primer di Polymerase Chain Reaction (PCR) specifici per le diverse regioni ipervariabili, è possibile amplificare porzioni del gene e, tramite il successivo sequenziamento, discriminare la composizione batterica specifica di quel campione (2,3).

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

Ricevuto: 10.06.2022

Revisionato: 28.06.2022

Accettato: 13.07.2022

Publicato on-line: 27.07.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.054

Negli ultimi anni è stato dimostrato che batteri commensali hanno un ruolo centrale per le funzioni immunologiche, metaboliche e di integrità dell'organismo (4). Per questo motivo, in questa rassegna vengono riassunte le conoscenze attuali sul ruolo fisiopatologico del microbiota intestinale nella malattia di Parkinson e viene discussa la possibilità che anche il microbiota nasale possa contribuire all'insorgenza e alla progressione della malattia.

IL MICROBIOTA INTESTINALE

La maggior parte dei microrganismi che costituiscono il microbiota umano risiede nell'intestino dove è ormai assimilato ad un vero e proprio organo. Il microbiota batterico intestinale è caratterizzato da sei principali phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Fusobacteria* (5) e partecipa a numerose funzioni fisiologiche, incluso lo sviluppo e il rafforzamento del sistema immunitario, il metabolismo energetico, le funzioni endocrine e intestinali. Inoltre, i microrganismi della flora autoctona inibiscono e prevengono l'invasione di agenti patogeni esogeni e provvedono a funzioni essenziali, quali la biosintesi di vitamine del gruppo B e di vitamina K, nonché la degradazione di carboidrati complessi derivanti da fibre vegetali non digeribili. Il microbiota intestinale è composto da $14 \times 10^{13}/10^{14}$ microrganismi con un patrimonio genetico totale di circa $2,3 \times 10^6$ geni, cento volte superiore al valore del genoma umano (6). Questa flora intestinale comprende tra le 500 e le 1000 specie batteriche; la maggiore affluenza si ha nel tratto del colon dove ci sono dalle 160 alle 500 specie differenti, ognuna con peculiari caratteristiche microbiologiche, di cui la stragrande maggioranza è rappresentata da batteri anaerobi stretti in grado di produrre energia e nutrienti per l'ospite e le comunità simbiotici (7). Anche se con distribuzione diversa a seconda del tratto, il microbiota è dominato dai phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che rappresentano insieme il 70% del totale, e dai *Bacteroides*, *Faecalibacterium* e *Bifidobacterium* come generi più abbondanti (8,9). La composizione del microbiota è specifica per ogni individuo e varia dalla fase pre-natale, a quella neonatale e nei primi tre anni di vita. Successivamente, si stabilizza rimanendo pressoché inalterata durante il periodo adulto (10-13). Dall'infanzia all'età avanzata, dove si osserva un aumento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*, importanti fattori possono influenzare la diversità del microbiota come: il genere, l'indice di massa corporea, il tipo di dieta, l'area geografica, la presenza di agenti antibatterici o pre/probiotici e il trattamento con specifici farmaci (inibitori di pompe protoniche, cortisonici e contraccettivi orali) (14-16). L'equilibrio tra le specie batteriche che compongono il microbiota viene definito "eubiosi" ed è indispensabile per la salute. Alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato come diversi disturbi gastrointestinali, come malattie infiammatorie intestinali, malattie metaboliche come il diabete, malattie autoimmuni come la celiachia possano alterare questo equilibrio e provocare quindi "disbiosi" con conseguente modificazione della distribuzione e

della composizione del microbiota (17-20). In particolare, un'alterazione dell'equilibrio nell'ecosistema microbico intestinale tra batteri simbiotici (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Enterococcus spp*, *Propionibacterium spp* e *Peptostreptococcus spi*) e opportunisti (*Bacteroides*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Enterobacteriales*, *Peptococcus spp*, *Stafilococcus spp* e lieviti) è associata a disordini gastrointestinali.

Interazioni tra microbiota intestinale e sistema nervoso centrale

La disbiosi può anche essere alla base di condizioni neurologiche complesse. È oggi noto che la composizione del microbiota intestinale può influenzare alcune funzioni del sistema nervoso centrale (SNC). Questo è possibile grazie all'esistenza di un collegamento morfo-funzionale bidirezionale tra mucosa intestinale (con coinvolgimento del sistema nervoso enterico, SNE) e SNC che va a creare il cosiddetto asse intestino-cervello in cui i segnali sono veicolati attraverso il nervo vago o le innervazioni spinali. Il SNC può modulare la motilità, l'immunità, la permeabilità e la secrezione di muco dell'intestino attraverso il sistema nervoso autonomo, o attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e indurre una iperproduzione di cortisolo, con una conseguente riduzione dell'espressione di proteine di adesione nell'epitelio intestinale e un incremento della sua permeabilità (21). In parallelo, il microbiota intestinale può inviare segnali, non solo attraverso il SNE, ma, grazie alla capacità dei batteri intestinali di sintetizzare specifici neurotrasmettitori e metaboliti, anche attraverso il flusso sanguigno e la barriera ematoencefalica (22-25). Tra i principali neurotrasmettitori ci sono l'acido g-amminobutirrico (GABA) sintetizzato da *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, la dopamina e noradrenalina sintetizzate da *Bacillus* e *Escherichia* e la serotonina prodotta da *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Klebsiella*. Tra i metaboliti, un importante ruolo viene svolto dagli acidi grassi a catena corta (SCFA). Gli SCFA sono i principali metaboliti prodotti dalla fermentazione batterica delle fibre alimentari, con concentrazioni totali di 50-200 mM nel colon, e possono legare specifici recettori immunologici e, successivamente, essere utilizzati come fonti di energia, come regolatori dell'espressione genica per l'integrità epiteliale e per interazioni immunologiche (26). I tre principali SCFA (acetato, propionato e butirato) (27) svolgono, inoltre, specifiche funzioni in ambito neurologico, come la stimolazione di cellule enterocromaffini per la produzione di serotonina, il controllo della maturazione e dello sviluppo della microglia, la modulazione del fattore di crescita nervoso (NGF) e del fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF), importanti per la crescita, la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni e delle sinapsi del SNC. In particolare, l'acetato altera i livelli dei neurotrasmettitori glutammato, glutammina e GABA nell'ipotalamo, mentre il propionato e il butirato agiscono sull'equilibrio neurochimico cerebrale, regolando i livelli di espressione della triptofano-5-idrossilasi 1, enzima importante per la sintesi della serotonina, e della tirosina idrossilasi che è coinvolta nella biosintesi di dopamina, noradrenalina e

adrenalina.

Partendo da queste evidenze, che sottolineano la stretta comunicazione tra il SNC e l'intestino, recenti studi hanno descritto come la disbiosi del microbiota intestinale sembri essere implicata in patologie comportamentali e neurologiche, come la depressione, il disturbo dello spettro autistico (ASD), la malattia di Alzheimer (AD), la sclerosi multipla (SM), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), le malattie da prioni e PD (28-34).

MALATTIA DI PARKINSON

La PD è una malattia neurodegenerativa frequente, che colpisce circa 1/100 delle persone nella sesta decade di vita. La PD si manifesta con disturbi motori, come la lentezza del movimento, rigidità e tremore. Tuttavia, prima della comparsa di questi sintomi, la malattia presenta una fase prodromica che è invece caratterizzata dalla comparsa di sintomi non motori che comprendono disturbi del sonno (iRBD), stipsi, depressione e perdita dell'olfatto.

Una delle caratteristiche neuropatologiche tipiche della PD riguarda la perdita dei neuroni dopaminergici della sostanza nera *pars compacta* (35). La perdita di queste cellule, e la conseguente riduzione di rilascio di dopamina, porta ad una disfunzione di altre strutture cerebrali, tra cui i nuclei della base, le cui funzioni sono necessarie per l'inizio e il controllo del movimento. Nei neuroni dopaminergici sono presenti aggregati proteici sia nel citoplasma (corpi di Lewy) che nei prolungamenti neuronali (neuriti di Lewy) formati principalmente da α -sinucleina (α -sin) mal-ripiegata che viene chiamata α -sin^D. I corpi di Lewy si trovano anche in altre regioni cerebrali, come i nuclei dorsali motori del nervo vago, il locus *coeruleus* e la corteccia entorinale. La causa della degenerazione neuronale e della formazione di aggregati di α -sin^D non è ancora chiara (36). Lo studio dei casi famigliari ha portato ad identificare fattori di rischio genetici, alcuni ad alta penetranza ma molto rari (ad esempio le mutazioni del gene *SNCA* che codifica per la proteina α -sin), altri invece più frequenti nella popolazione ma a penetranza ridotta (varianti del gene *GBA* e *LRRK2*) (37).

Evidenze scientifiche crescenti dimostrerebbero che l' α -sin^D, oltre a formare gli aggregati proteici intraneuronali caratteristici della PD, abbia proprietà patologiche vere e proprie e sia coinvolta nell'insorgenza e progressione della malattia. Gli aggregati di α -sin^D si propagano tra i neuroni. Quando invadono un nuovo neurone, gli aggregati di α -sin^D sono in grado di interagire con α -sin normale (che abbonda a livello delle sinapsi) inducendone un cambiamento conformazionale che la trasforma in α -sin^D (38,39). Quest'ultima entrerà quindi a far parte del deposito proteico. Attraverso questo meccanismo l' α -sin^D si propaga in modo molto efficiente nel SNC.

Tuttavia, oltre ad essere presente nei neuroni del SNC, l' α -sin^D è stata identificata anche nel SNE, soprattutto in fasi iniziali di malattia e sembrerebbe contribuire all'insorgenza di disturbi gastrointestinali, tra cui costipazione e compromissione della funzione motoria del colon. Una delle ipotesi relative all'eziopatogenesi

della PD riguarda proprio la possibilità che alterazioni del microbiota intestinale possano promuovere la formazione di α -sin^D a livello locale (mucosa intestinale) e che questa possa poi raggiungere il cervello, attraverso l'asse intestino/cervello, provocando le alterazioni cliniche e neuropatologiche tipiche della malattia. A supporto di questa ipotesi, i pazienti con PD hanno depositi di α -sin^D nel SNE e un microbiota intestinale alterato rispetto ai soggetti sani. Per questo motivo, si sono intensificati gli studi di correlazione tra microbiota intestinale e PD. Come descritto più avanti, interessanti scoperte hanno mostrato che α -sin^D prima di depositarsi nei neuroni del SNC, si accumula sia nel plesso enterico dello stomaco che nel bulbo olfattivo (40). Per questo motivo è stato proposto che gli eventi iniziali della PD, tra cui la formazione di α -sin^D, coinvolgano strutture periferiche (intestino e naso) e che da qui la patologia raggiunga poi il cervello (teoria del "doppio colpo") (40). Nei due paragrafi successivi sono descritte le correlazioni esistenti tra microbiota intestinale e microbiota nasale e PD, alla luce delle più recenti scoperte scientifiche.

Microbiota intestinale e malattia di Parkinson

Come precedentemente accennato, l' α -sin non è espressa solo nel SNC, ma è anche prodotta e rilasciata dai neuroni del SNE e ha un ruolo fondamentale nel rilascio/assorbimento di neurotrasmettitori (41). Aggregati patologici di α -sin^D sono stati osservati in biopsie di tessuti gastrointestinali di pazienti con PD; questo dato è di supporto all'ipotesi che la PD possa avere origine dall'intestino (42). Inoltre, l' α -sin^D è stata ritrovata anche in ghiandole salivari, esofago e stomaco, organi potenzialmente coinvolti nella sintomatologia non motoria comune nella PD, come ipersalivazione, disfagia, svuotamento gastrico ritardato e gastroparesi (43). Studi pubblicati da Braak et al. nel 2003 (44) e Hawkes et al. nel 2007 (40) supportano il coinvolgimento del tratto gastrointestinale nello sviluppo e progressione della PD, suggerendo che l' α -sin^D possa originarsi nel sistema gastrointestinale e che poi, tramite trasporto retrogrado lungo le proiezioni neuronali proprie del SNE, raggiunga il SNC e da qui si diffonda in maniera caudo-rostrale dal tronco cerebrale a diversi distretti nervosi. Oltre ad aver dimostrato la presenza di aggregati di α -sin^D nel nervo vago (45), studi condotti su modelli animali di PD hanno dimostrato che l'inoculo di α -sin^D nel tratto gastrointestinale dei topi è in grado di indurre deposizione di α -sin^D nel SNC (46,47). La presenza di un microbiota intestinale sano non solo ha effetti benefici sulle strutture proprie del sistema gastrointestinale, ma promuove l'integrità della barriera emato-encefalica, mediante regolazione delle proteine coinvolte nelle giunzioni occludenti, e produzione di acidi grassi a catena corta. Una condizione di disbiosi a livello del microbiota può essere associata ad un aumento dell'abbondanza relativa di specie batteriche detrimental, con conseguente compromissione dell'integrità intestinale e produzione di tossine batteriche ad attività infiammatoria [come ad esempio il lipopolisaccaride (LPS)] (48). In particolare, è noto come LPS interagisca a livello periferico con le cellule del sistema immunitario,

stimolando il rilascio di citochine pro-infiammatorie; inoltre, è stato dimostrato come LPS possa indurre la formazione di α -sin^D in modelli sperimentali (49). In seguito all'interazione eteromolecolare tra LPS e α -sin si osserva la formazione di α -sin^D con proprietà strutturali e patologiche ben definite (50). Ulteriori dati suggeriscono che anche altre molecole batteriche, in particolare le proteine amiloidi, possono promuovere la formazione dell' α -sin^D. Il microbiota intestinale infatti produce diverse proteine "amiloidi", tra cui la proteina "curli", espresse in abbondanza da ceppi intestinali come *Escherichia coli*. In topi transgenici che sovraesprimono α -sin umana, è stato dimostrato che la colonizzazione con *Escherichia coli* è in grado di promuovere formazione di α -sin^D in intestino e cervello (51,52).

Oltre alle problematiche strutturali, nel contesto della PD è importante sottolineare come il microbiota intestinale possa interferire con altri processi patologici importanti legati alla malattia. È noto, infatti, come i batteri intestinali (in particolare *Prevotella*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*) contribuiscano in modo determinante alla biodisponibilità nel SNE e nel SNC della dopamina (neurotrasmettitore chiave nella PD). Diversi studi associano cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale e nella produzione di dopamina con la patogenesi e la manifestazione clinica dei pazienti (50). Come riportato sopra, la fisiopatologia della PD è attribuita ad accumulo di α -sin^D che interferisce con la trasmissione sinaptica dei neuroni dopaminergici e quindi con conseguente riduzione di biodisponibilità di dopamina. La perdita di dopamina a livello del sistema nervoso periferico (SNP) e SNE si manifesta con malfunzionamenti gastrointestinali, tra cui ritardato svuotamento gastrico e dismotilità intestinale. Inoltre, la neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici nella via nigro-striatale porta a sintomi motori, tra cui bradicinesia, tremori a riposo e instabilità posturale. Questi sintomi motori sono stati direttamente associati a cambiamenti della composizione microbica nell'intestino (53). È stato dimostrato che alcuni ceppi batterici intestinali esercitano effetti neuroprotettivi sui neuroni dopaminergici per attenuare la perdita di dopamina, mentre altri possono esercitare effetti negativi stimolando ulteriormente risposte infiammatorie attraverso la produzione di endotossine. Nel complesso quindi si osserva riduzione della condizione di eubiosi intestinale nei pazienti PD, a favore di uno stato di disbiosi con elevati livelli relativi di batteri potenzialmente patologici. Sono stati eseguiti studi di genotipizzazione molecolare delle specie microbiche presenti nel tratto gastro-intestinale in pazienti PD, con risultati abbastanza comparabili, anche se sono presenti alcune discrepanze. In particolare, tutti i principali *phyla* batterici presentano alterazioni nella composizione relativa, a livelli diversi, nei pazienti PD; i cambiamenti nelle specie microbiche intestinali possono essere considerati biomarcatori prodromici indicanti l'esordio precoce della malattia (54). Sono stati descritti livelli aumentati per *Akkermansia muciniphila*, *Enterobacteriaceae*, *Eggerthella*, *Oscillibacter*, *Escherichia/Shigella*, *Lachnospiraceae* e *Streptococcus*

e una diminuzione per *Roseburia*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium ed Eubacterium* biforme (55). Inoltre, i livelli di *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Ruminococcus* sono risultati elevati mentre *Prevotella*, *Bacteroides* e *Clostridium* sono stati osservati diminuiti nei pazienti PD (56). I risultati riguardanti l'abbondanza di *Lactobacillus* sembrano essere, invece, discordanti in letteratura, dove vengono descritti sia incrementi che diminuzioni di questo genere microbico nel contesto della PD (57). Le possibili variazioni nella composizione di specifiche famiglie/generi batterici nella PD sono riassunte nella Tabella 1.

In conclusione, importanti marcatori patologici nel tratto gastrointestinale possono essere attribuiti a cambiamenti microbici intestinali con associato aumento dell'infiammazione intestinale, secrezione di LPS e accumulo di α -sin^D; i pathway retrogradi dell'innervazione vagale trasferiscono queste alterazioni a livello del SNC, portando quindi allo sviluppo degli effetti neurodegenerativi a carico dei neuroni dopaminergici, propri della PD.

Gli studi che hanno dimostrato un legame tra lo stato del microbiota intestinale e i processi neurodegenerativi in patologie neurologiche come la PD rappresentano sicuramente un significativo passo avanti nella comprensione dei complessi meccanismi patogenetici. Comprendere il ruolo del microbiota intestinale nella modulazione dell'attività e della biodisponibilità della dopamina sia a livello del SNP che del SNC potrà aiutare ad identificare nuove terapie e ottimizzare i metodi disponibili per prevenire, ritardare o ripristinare i deficit dopaminergici nei disturbi neurologici o metabolici.

Microbiota nasale e malattia di Parkinson

Lo studio del microbiota nasale e di una sua potenziale correlazione con la PD è ancora agli albori. Una ricerca in banche dati effettuata specificamente per questa rassegna ha fornito solo quattro lavori su questa tematica (49-52). Pereira et al. hanno analizzato il microbiota nasale di 69 pazienti con PD e 67 controlli sani tramite sequenziamento 16S NGS (regione V1 e V3). I campioni sono stati prelevati tramite tampone nasale effettuato nella regione tra il setto e il turbinato medio. Queste analisi hanno permesso di identificare un totale di 553 generi, 177 famiglie, 96 ordini, 49 classi e 28 *phyla*. Il genere presente maggiormente in entrambi i gruppi era *Corynebacterium* seguito da *Propionibacterium*, *Moraxella*, *Staphylococcus* e *Burkholderia*. Nonostante la varietà di microrganismi riscontrati, non è stato possibile rilevare nessuna differenza in termini di diversità alfa o beta tra pazienti con PD e gruppo controllo (58).

Heintz-Buschart et al. (50), tramite sequenziamento NGS per 16S rRNA, 18S rRNA e metagenomica shotgun (sequenziamento dell'intero pool di DNA estratto direttamente dal campione di interesse, ovvero analisi delle sequenze sia dell'ospite che di tutti i microrganismi, inclusi batteri, *archaea*, funghi, virus e protozoi), hanno analizzato il microbiota di campioni di lavaggio nasale di 76 pazienti con PD e 78 controlli sani. Questo lavoro ha evidenziato una elevata eterogeneità tra campioni a tutti i livelli tassonomici, con però una sola unità tassonomica

Tabella 1

Alterazioni dei livelli di taxa (specificati per phylum, famiglia e genere) nel microbiota intestinale di pazienti affetti da malattia di Parkinson

Phylum	Famiglia	Genere	Livello	Ref
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	↑	(56)
Firmicutes	Enterococcaceae	Enterococcus	↑	(66)
	Lactobacillaceae	Lactobacillus	↓	(57,67)
				↑
	Clostridiaceae	Clostridium	↓	(68)
	Lachnospiraceae	Ruminococcus	↑	(69)
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	Akkermansia	↑	(70)
Bacteroidetes	Prevotellaceae	Prevotella	↓	(50)
	Bacteroidaceae	Bacteroides	↓	(50)

operativa (OTU) del genere *Corynebacterium* comune a tutti i soggetti. Anche in questo studio non sono state rilevate differenze significative in grado di discriminare i pazienti PD dai controlli. Ulteriori analisi statistiche, considerando 70 dati antropometrici, hanno permesso tuttavia di rilevare che sesso e altezza dei soggetti fossero in grado di influenzare la comunità procariotica. Infine, confronti tra pazienti PD in terapia farmacologica con levodopa (L-DOPA) e pazienti non in trattamento hanno mostrato una maggiore abbondanza relativa di Bacillaceae nei pazienti trattati (59).

Nel 2021 Pal et al. (51) hanno analizzato la comunità batterica presente nella cavità nasale di 30 pazienti con PD e 28 soggetti sani, tramite sequenziamento multi-amplicone del gene 16S rRNA (regioni V1-V9). In questo caso il campionamento è stato effettuato a livello della fessura olfattiva tramite l'utilizzo di un endoscopio rigido. I risultati di queste analisi si sono rivelati decisamente più promettenti rispetto ai dati dei primi due studi. In particolare, è stato osservato che, rispetto ai controlli, i pazienti PD tendevano ad avere quantità maggiori di specie pro-infiammatorie tra cui *Moraxella catarrhalis* e *Ralstonia insidiosa*. In aggiunta, i pazienti con quantità maggiori di *Moraxella catarrhalis* e altri batteri pro-infiammatori tendevano a mostrare sintomi di PD più gravi. Oltre ad alti livelli di batteri pro-infiammatori, i pazienti tendevano anche ad avere quantità inferiori di batteri con proprietà anti-infiammatorie, tra cui *Blautia wexlerae*, *Lachnospira pectinoschiza* e *Propionibacterium humerusii*, noti per essere in grado di produrre SCFA nell'ambiente gastrointestinale. L'ulteriore impiego di analisi mediante Machine Learning ha permesso di identificare otto taxa caratteristici dei pazienti PD: *Escherichia albertii*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Macroccoccus brunensis*, *Ralstonia insidiosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia xenovorans* e *Acinetobacter guillouiae*. Infine, valutazioni cliniche

come la gravità dei sintomi motori [valutati tramite la scala Movement Disorder Society - Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) che è costituita da diversi quesiti divisi in quattro sezioni che riguardano: esperienze non motorie della vita quotidiana, esperienze motorie di vita quotidiana, esame motorio e complicanze motorie associate alla PD] e le funzioni olfattive sono risultate positivamente correlate con *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus epidermidis* e con la specie batterica commensale *Peptoniphilus asaccharolyticus*. I risultati di questo studio hanno permesso di individuare un ambiente microbico pro-infiammatorio e disbiotico nella cavità nasale profonda di pazienti PD con caratteristiche diverse dai soggetti sani (60).

Li et al. hanno eseguito analisi su campioni batterici presenti nella cavità nasale anteriore di 91 pazienti con PD e 91 controlli mediante sequenziamento della regione V4-V5 del gene 16S rRNA, che si sono concentrate sui generi più comuni (*Stenotrophomonas*, *u-Corynebacteriaceae* e *Staphylococci*). I dati ottenuti da questo studio hanno individuato alti valori di abbondanza relativa di *g unidentificata Corynebacteriaceae*, o *Corynebacteriales*, *f Corynebacteriaceae*, e *s Corynebacterium sp KPL1855* nel gruppo dei PD (61).

Le possibili variazioni nella composizione di specifiche famiglie/generi batterici nel microbiota nasale dei pazienti PD sono riassunte nella Tabella 2.

Come descritto precedentemente, l'alterazione dell'olfatto rappresenta un sintomo prodromico di PD. Per questo motivo la disbiosi che si osserva a livello delle cavità nasali può essere responsabile della perdita di olfatto che colpisce più dell'80% dei soggetti in fasi precliniche di malattia (62,63). Questa disbiosi può altresì promuovere la formazione di α -sin^D la quale, depositandosi nei neuroni della mucosa olfattiva, può contribuire al disturbo olfattivo ma anche iniziare il suo percorso di trasporto retrogrado che le consente di migrare nel bulbo olfattivo e infine nell'encefalo.

Tabella 2

Alterazione dei livelli di taxa (specificati per phylum, famiglia e genere) nel microbiota nasale di pazienti affetti da malattia di Parkinson

Phylum	Famiglia	Genere	Livello	Ref
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	Propionibacterium humerusii	↓	(60)
		unidentified	↑	(61)
	Corynebacteriaceae			
			↑	(61)
Nocardoidaceae	Marmoricola	↓	(58)	
Proteobacteria	Moraxellaceae	Moraxella catarrhalis	↑	(60)
	Burkholderiaceae	Ralstonia insidiosa	↑	(60)
Firmicutes	Lachnospiraceae	Blautia wexlerae	↓	(60)
		Lachnospira pectinoschiza	↓	(60)

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni la ricerca sul microbiota ha fatto notevoli passi in avanti soprattutto grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, tra cui il sequenziamento high-throughput (che consente di analizzare la composizione e le funzioni della flora batterica approfondendo aspetti che prima risultavano complessi e quasi impossibili da valutare), la metagenomica shotgun, la metatrascrittomica, la metabolomica, la metaproteomica e l'utilizzo di organoidi ingegnerizzati derivati da cellule staminali umane (64,65). Queste analisi hanno dimostrato che la perdita dell'eubiosi (soprattutto intestinale) può portare all'insorgenza di diverse patologie non solo a carico dell'apparato gastro-intestinale, ma anche a livello del SNC, ovvero disordini neurodegenerativi come la PD. Considerando infatti che molti sintomi non motori che precedono la comparsa clinica della PD coinvolgono l'intestino, dove è possibile rilevare depositi di α -sin^D, si è cercato di studiare se alterazioni dell'eubiosi intestinale potessero contribuire all'insorgenza e alla progressione della malattia. Dai molteplici studi pubblicati, sappiamo oggi che esistono correlazioni importanti tra alterazioni del microbiota intestinale e PD (32). Considerando poi che un altro segno prodromico di PD è la perdita dell'olfatto e che depositi di α -sin^D si localizzano nei neuroni della mucosa olfattiva di soggetti in fase preclinica di malattia, si è iniziato a studiare il possibile ruolo del microbiota nasale nell'insorgenza e progressione della malattia. Gli studi in questo settore sono ancora preliminari. Tuttavia, se consideriamo che l'agente causale di questa malattia è l' α -sin^D e che la sua formazione può dipendere da prodotti batterici (ad esempio proteine amiloidi tra cui curli o molecole come LPS) che si generano in seguito a disbiosi, non sorprenderebbe affatto che organi e tessuti

periferici che hanno collegamenti con il SNC in cui si genera α -sin^D fungano da siti di origine della malattia.

Campioni di mucosa olfattiva possono essere prelevati in modo molto semplice e non invasivo, e possono essere ripetuti nel tempo. Questi aspetti rendono la mucosa olfattiva un'ottima sorgente di materiale biologico per usi diagnostici e di ricerca, ancora poco sfruttata. Tuttavia, la disponibilità di test ultrasensibili (quali i "seed amplification assays"), capaci di identificare tracce di α -sin^D in questi campioni (anche in fasi precliniche), e la disponibilità di protocolli sempre più affidabili che consentono di analizzare in modo molto accurato il microbiota nasale, ci consentiranno di rivalutare la mucosa olfattiva in ambito diagnostico. In particolare, combinando i due approcci analitici (seed amplification assays e analisi molecolari/bioinformatiche del microbiota) sarà possibile stabilire se e in quale misura il microbiota nasale può effettivamente avere un ruolo cruciale nella formazione di α -sin^D. Oggi sappiamo che esistono diversi fenotipi clinici di PD e dati di letteratura suggeriscono che questi correlino con diverse conformazioni anomale di α -sin^D. Sarà quindi importante valutare se differenti alterazioni del microbiota siano in grado di influenzare le conformazioni anomale di α -sin^D, ponendo quindi le basi per spiegare l'eterogeneità fenotipica della malattia (Figura 1).

Se verrà confermato che la disbiosi nasale contribuisce all'insorgenza del PD, sarà possibile sviluppare approcci terapeutici innovativi e personalizzati volti a ristabilire l'eubiosi, riducendo i ceppi batterici dannosi (ad esempio tramite somministrazione di antibiotici selettivi) e introducendo ceppi batterici alternativi (come i probiotici). Potendo effettuare prelievi periodici di mucosa olfattiva si potranno monitorare i cambiamenti del microbiota in seguito a trattamento farmacologico, per valutarne l'efficacia. Infine, poiché esistono dei sintomi prodromici

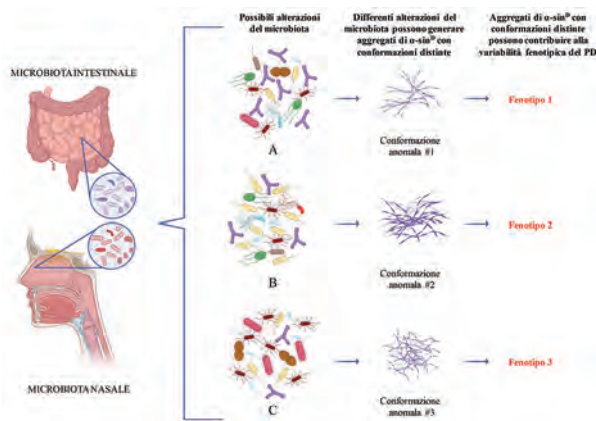


Figura 1
Ipotesi relativa al possibile contributo del microbiota intestinale e nasale nell'indurre un riarrangiamento strutturale della α -sin con generazione di aggregati proteici differenti potenzialmente responsabili dell'insorgenza della PD e della sua eterogeneità fenotipica. Created with BioRender.com.

di malattia, quali il disturbo del sonno, la costipazione e la perdita dell'olfatto, si potranno selezionare gruppi di pazienti da sottoporre a prelievo ed analisi di mucosa olfattiva. Questo consentirà di stabilire se e quanto prima rispetto alla comparsa dei sintomi classici associati alla PD compare disbiosi e se questa permetta di identificare in modo accurato i soggetti a maggior rischio di sviluppare PD. Diagnosticare precocemente la PD è la chiave per massimizzare l'efficacia dei trattamenti riducendo significativamente la progressione della malattia.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Laudadio I, Fulci V, Stronati L, et al. Next-Generation Metagenomics: Methodological Challenges and Opportunities. *OMICS* 2019;23:327-33.
2. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:299-305.
3. Veneruso I, Tomaiuolo R, Cariati F, et al. Il microbiota umano: il buono, il brutto e il cattivo. *Biochim Clini* 2021;45:109-22.
4. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 2013;29:51-8.
5. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-80.
6. Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018;361:k2179.
7. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
8. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy

Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 2019;7:14.

9. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol* 2016;39:1-12.
10. Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB, et al. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:3.
11. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:11971-5.
12. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 2012;150:470-80.
13. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001;48:198-205.
14. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009;9:123.
15. Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, et al. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol* 2016;18:2103-16.
16. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, et al. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 2013;69:52-60.
17. Alshehri D, Saadah O, Mosli M, et al. Dysbiosis of gut microbiota in inflammatory bowel disease: Current therapies and potential for microbiota-modulating therapeutic approaches. *Bosn J basic Med Sci* 2021;21:270-83.
18. Leonard MM, Valitutti F, Karathia H, et al. Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021;118:e2020322118.
19. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *Bereswill S, editor. PLoS One* 2010;5:e9085.
20. D'Argenio V, Precone V, Casaburi G, et al. An altered gut microbiome profile in a child affected by Crohn's disease normalized after nutritional therapy. *Am J Gastroenterol* 2013;108:851-2.
21. Sudo N. Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:177-94.
22. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 2015;18:965-77.
23. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 2014;6(263): 263ra158.
24. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res* 2018;1693:128-33.
25. Farzi A, Fröhlich EE, Holzer P. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* 2018; 15:5-22.
26. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017;19:29-41.
27. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:25.
28. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, et al. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;58:1-15.
29. Pulikkan J, Mazumder A, Grace T. Role of the Gut

- Microbiome in Autism Spectrum Disorders. *Adv Exp Med Biol* 2019;1118:253-69.
30. Boziki MK, Kesidou E, Theotokis P, et al. Microbiome in Multiple Sclerosis: Where Are We, What We Know and Do Not Know. *Brain Sci* 2020;10:234.
 31. Boddy SL, Giovannelli I, Sassani M, et al. The gut microbiome: a key player in the complexity of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *BMC Med* 2021;19:13.
 32. Shen T, Yue Y, He T, et al. The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson's Disease, a Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci* 2021;13:636545.
 33. Limbana T, Khan F, Eskander N. Gut Microbiome and Depression: How Microbes Affect the Way We Think. *Cureus* 2020;12:e9966.
 34. D'Argenio V, Sarnataro D. Microbiome Influence in the Pathogenesis of Prion and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:4704.
 35. Kalia L V, Lang AE. Around the world in a month. *Nat Biotechnol* 2015;33:896.
 36. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord* 2017;32:1264-310.
 37. Di Fonzo A, Monfrini E, Erro R. Genetics of movement disorders and the practicing clinician; who and what to test for? *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018;18:37.
 38. Cazzaniga FA, De Luca CMG, Bistaffa E, et al. Cell-free amplification of prions: Where do we stand? *Prog Mol Biol Transl Sci* 2020;175:325-58.
 39. Bellomo G, Giulia De Luca CM, Paoletti FP, et al. Alpha synuclein seed amplification assays for diagnosing synucleinopathies: the way forward. *Neurology* 2022.
 40. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:599-614.
 41. Grathwohl SA, Steiner JA, Britschgi M, et al. Mind the gut: secretion of α -synuclein by enteric neurons. *J Neurochem* 2013;125:487-90.
 42. Sánchez-Ferro Á, Rábano A, Catalán MJ, et al. In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:517-24.
 43. Fayyad M, Salim S, Majbour N, Erskine D, et al. Parkinson's disease biomarkers based on α -synuclein. *J Neurochem* 2019;150:626-36.
 44. Braak H, Rüb U, Gai WP, et al. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 2003;110:517-36.
 45. Musgrove RE, Helwig M, Bae E-J, et al. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α -synuclein transfer. *J Clin Invest* 2019;129:3738-53.
 46. Kim S, Kwon S-H, Kam T-I, et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron* 2019;103:627-41.e7.
 47. Challis C, Hori A, Sampson TR, et al. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nat Neurosci* 2020;23:327-36.
 48. Ghosh SS, Wang J, Yannic PJ, et al. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J Endocr Soc* 2020;4:bvz039.
 49. Kim C, Lv G, Lee JS, et al. Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of α -synuclein fibril. *Sci Rep* 2016;6:30891.
 50. Burokas A, Moloney RD, Dinan TG, et al. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Adv Appl Microbiol* 2015;91:1-62.
 51. Sampson TR, Challis C, Jain N, et al. A gut bacterial amyloid promotes α -synuclein aggregation and motor impairment in mice. *Elife* 2020;9:e53111.
 52. Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, et al. Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged fischer 344 rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep* 2016;6:34477.
 53. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:1351-60.
 54. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015;30:350-8.
 55. Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, et al. Meta-analysis of gut dysbiosis in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2020;35:1626-35.
 56. Jin M, Li J, Liu F, et al. Analysis of the gut microflora in patients with parkinson's disease. *Front Neurosci* 2019;13:1184.
 57. Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord* 2017;32:739-49.
 58. Pereira PAB, Aho VTE, Paulin L, et al. Oral and nasal microbiota in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2017;38:61-7.
 59. Heintz-Buschart A, Pandey U, Wicke T, et al. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov Disord* 2018;33:88-98.
 60. Pal G, Ramirez V, Engen PA, et al. Deep nasal sinus cavity microbiota dysbiosis in Parkinson's disease. *Park Dis* 2021;7:111.
 61. Li Z, Lu G, Luo E, et al. Oral, nasal, and gut microbiota in parkinson's disease. *Neuroscience* 2022;480:65-78.
 62. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2012;8:329-39.
 63. Bargar C, De Luca CMG, Devigili G, et al. Discrimination of MSA-P and MSA-C by RT-QuIC analysis of olfactory mucosa: the first assessment of assay reproducibility between two specialized laboratories. *Mol Neurodegener* 2021;16:82.
 64. Arnold JW, Roach J, Azcarate-Peril MA. Emerging Technologies for Gut Microbiome Research. *Trends Microbiol* 2016;24:887-901.
 65. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci* 2020;65:674-85.
 66. Li W, Wu X, Hu X, et al. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Sci China Life Sci* 2017;60:1223-33.
 67. Li Z, Lu G, Li Z, et al. Altered Actinobacteria and Firmicutes Phylum Associated Epitopes in Patients With Parkinson's Disease. *Front Immunol* 2021;12:632482.
 68. Bedarf JR, Hildebrand F, Coelho LP, et al. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Med* 2017;9:39.
 69. Maini Rekdal V, Bess EN, Bisanz JE, et al. Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science* 2019;364:eaau6323.
 70. Dodiya HB, Forsyth CB, Voigt RM, et al. Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2020;135:104352.

Humoral response post-BNT162b2 single booster in pre-vaccination baseline SARS-CoV-2 seronegative and seropositive subjects

Gian Luca Salvagno^{1,2}, Brandon M. Henry^{3,4}, Laura Pighi^{1,2}, Simone De Nitto^{1,2}, Gianluca Gianfilippi⁵, Giuseppe Lippi¹

¹Section of Clinical Biochemistry, University of Verona, Verona, Italy

²Service of Laboratory Medicine, Pederzoli Hospital, Peschiera del Garda, Italy

³Clinical Laboratory, Division of Nephrology and Hypertension, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA

⁴Disease Intervention & Prevention and Population Health Programs, Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, Texas, USA

⁵Medical Direction, Pederzoli Hospital, Peschiera del Garda, Italy

ABSTRACT

Background: we report here data on humoral immune response post-BNT162b2 primary vaccination and booster in pre-vaccination baseline severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) seronegative and seropositive subjects.

Methods: the study population consisted in 51 baseline SARS-CoV-2 seronegative and 11 baseline SARS-CoV-2 seropositive subjects, who underwent primary mRNA-based BNT162b2 vaccination (two doses) followed by homologous booster administration (third dose). Venous blood was sequentially collected up to 1 months after vaccine booster administration, and humoral response was monitored by measuring anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG antibodies.

Results: the humoral response after the three doses of BNT162b2 displayed an overlapping trend in the two groups, although the baseline and post-primary vaccination concentration of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG were constantly higher in baseline SARS-CoV-2 seropositive than in baseline SARS-CoV-2 seronegative subjects (all $p < 0.001$). Unlike before vaccine booster administration, the levels of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG, 1 month after receiving the third BNT162b2 dose were not significantly different between pre-vaccination baseline SARS-CoV-2 seropositive and seronegative subjects (7 430 versus 9 020 kBAU/L; $p = 0.232$). In both cohorts, all recipients of vaccine booster displayed antibodies levels > 264 kBAU/L.

Conclusion: the results of this study demonstrate that although baseline SARS-CoV-2 seropositive subjects have magnified humoral response to primary BNT162b2 vaccination, vaccine booster generates anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG values not different from those found in baseline SARS-CoV-2 seronegative subjects. Thus, this study provides evidence that a prior SARS-CoV-2 infection does not mitigate the need for additional vaccine boosters.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies

INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a life-threatening viral infection sustained by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Several lines of evidence now attest that COVID-19 vaccination is the most efficient strategy for preventing clinically unfavourable consequences of infection, as well as for limiting virus circulation and preventing the constant emergence of new and highly mutated strains (1). One fact that has clearly emerged after one year from the initiation of the worldwide COVID-19 vaccination campaign, is that the immune response varies widely in recipients, both in terms of magnitude and duration. More specifically, there are several aspects that can influence vaccine reactogenicity and post-vaccination immune response. These typically

include vaccine factors (e.g., interval, number and volume of doses), viral factors (e.g., antigenic phenotype, transmissibility and virulence), along with host factors like age, comorbidities and immune status (2). Laboratory monitoring and surveillance seems now feasible and reliable strategies to optimize vaccine administration, by prioritizing the usage of primary vaccination and boosters in those with blunted immune response, rapid decline, and/or at risk of developing more severe forms of COVID-19 illness (3). Several previous studies, recently reviewed by Notarte et al. (4), concluded that pre-vaccination baseline SARS-CoV-2 serostatus (i.e., presence or absence of an immune response developed after a SARS-CoV-2 infection) may strongly influence the immune response after primary COVID-19 vaccination, though lesser is known regarding the impact on serum anti-SARS-CoV-2 antibodies levels

Corresponding author: Giuseppe Lippi, Section of Clinical Biochemistry University Hospital of Verona Piazzale L.A. Scuro, 10 37134 Verona – Italy Email: giuseppe.lippi@univr.it

Received: 14.03.2022

Revised: 30.03.2022

Accepted: 31.03.2022

Published on-line: 14.04.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.019

after receiving vaccine boosters. Therefore, this study aimed to compare the humoral response post-COVID-19 vaccination plus single booster in baseline SARS-CoV-2 seronegative and seropositive subjects.

METHODS

The leading aspects of this serosurveillance study have been earlier reported (5,6). In brief, the original cohort consisted of over 900 healthcare workers of the Hospital Pederzoli in Peschiera del Garda (Italy), who voluntarily underwent primary vaccination with the mRNA-based Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccine (Pfizer Inc., New York, NY, US; two 30 µg doses, separated by 3 weeks), followed by administration of a homologous vaccine booster (single dose, 30 µg) >8 months after primary vaccination. Molecular testing for diagnosing asymptomatic or symptomatic SARS-CoV-2 infection was carried out at 2-4 weeks intervals, throughout the study period, with either Altona Diagnostics RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit (Altona Diagnostics GmbH, Hamburg, Germany) or Seegene Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene Inc., South Korea). Venous blood samples, collected by venipuncture immediately before receiving the primary vaccination cycle, were then recollected after 1, 3 and 6 months, and finally before and 1 month after the administration of the homologous vaccine booster. The humoral response was monitored by measuring the serum levels of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG, using the DiaSorin Trimeric spike IgG immunoassay on Liaison XL (DiaSorin, Saluggia, Italy). The main analytical and clinical characteristics of this test are comprehensively reported elsewhere (7). In summary, this assay displays excellent agreement (i.e., 87%, with diagnostic 96% sensitivity and 85% specificity) with the reference plaque reduction neutralization test (PRNT). The limit of quantitation for defining the seropositive status is 4.81 kBAU/L. Results of all measurements were presented as median and interquartile range

(IQR). The significance of difference between the two cohorts of baseline SARS-CoV-2 seronegative and seropositive subjects was estimated with Mann-Whitney and chi square test, when appropriate, using Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK). All subjects provided written consent for both receiving BNT162b2 primary vaccination and booster, as well as for having their blood collected for serosurveillance monitoring. This observational retrospective study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Verona and Rovigo Provinces (59COVIDCESC; November 3, 2021).

RESULTS

The final study population consisted of 62 subjects (6.7% of the original sample), who received all the three BNT162b2 vaccine doses, had their blood collected for specifically measuring anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG and did not develop incident SARS-CoV-2 infection throughout the study period (all other participants did not receive all three vaccine doses, missed one or more time points, or developed an incident SARS-CoV-2 infection up to 1 month after receiving the vaccine booster). Eleven of these subjects (median age, 45 years; IQR, 26-48 years; 55% females) were pre-vaccination baseline SARS-CoV-2 seropositive (all with serum antibodies values >4.81 kBAU/L), whilst the remaining 51 (median age, 44 years; IQR, 34-54 years; 47% females) were baseline SARS-CoV-2 seronegative (all with serum antibodies values <4.81 kBAU/L). Age ($p=0.093$) and sex ($p=0.203$) did not significantly differ between these two cohorts.

The humoral response after the three doses of BNT162b2 is shown in Figure 1. Immediately before vaccination, the serum values of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG were obviously higher in baseline SARS-CoV-2 seropositive compared to seronegative subjects (<4.81 versus 56 kBAU/L; $p<0.001$). A rather similar kinetics was then noted after primary BNT162b2

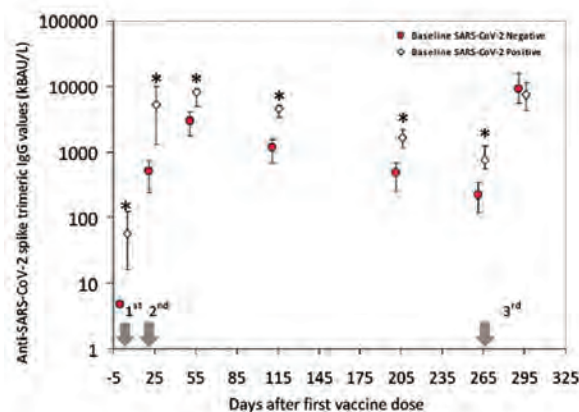


Figure 1

Variation of serum anti-SARS-CoV-2 spike trimeric RBD IgG antibodies levels (median and interquartile range) in baseline SARS-CoV-2 seronegative ($n=51$) and seropositive ($n=11$) recipients of BNT162b2 mRNA-based primary vaccination and booster. The gray arrows indicate the time of administration of the three mRNA-based BNT162b2 vaccine doses.

* $p<0.001$.

SARS-CoV-2, severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; RBD, Receptor Binding Domain

vaccination between the two cohorts, although serum antibodies concentrations remained constantly higher in baseline SARS-CoV-2 seropositive than in seronegative subjects (all $p < 0.001$) (Figure 1). Unlike at previous time points, the levels of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG, 1 month after receiving the BNT162b2 booster were not significantly different between pre-vaccination baseline SARS-CoV-2 seropositive and seronegative subjects (7 430 versus 9 020 kBAU/L; $p = 0,232$). In both cohorts, all subjects receiving the BNT162b2 booster dose displayed post-boost serum levels of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG > 264 kBAU/L, which corresponds to the 80% threshold of vaccine efficacy against symptomatic disease (Figure 2) (8).

DISCUSSION

The results of this serosurveillance study aimed at comparing the humoral response post-BNT162b2 booster in baseline SARS-CoV-2 seronegative and seropositive subjects, confirm previous evidence, but also provide interesting new aspects.

First, despite exhibiting a globally comparable trend over time, the humoral response recorded after completing a primary vaccination cycle with the mRNA-based BNT162b2 vaccine was confirmed to be considerably higher in baseline SARS-CoV-2 seropositive subjects, with values up to 3-fold higher 1 month after the second primary dose compared to baseline SARS-CoV-2 seronegative subjects (8 060 versus 2 938 kBAU/L; $p < 0.001$). Then, the serum values of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG remained constantly higher in the baseline SARS-CoV-2 seropositive cohort up to over 8 months (serum values before vaccine booster: 769 versus 221 kBAU/L; $p < 0.001$), thus mirroring a likely higher protection against any type of SARS-CoV-2 infection, but especially against symptomatic disease. Nonetheless, a virtually unexpected trend has emerged after administration of the BNT162b2 single booster dose, wherein the serum levels of anti-SARS-

CoV-2 spike trimeric IgG measured 1 month after the booster become similar between baseline SARS-CoV-2 seropositive and seronegative individuals ($p = 0,232$). This can be basically interpreted in one of two ways. First, it is likely that the earlier amplifying effect of SARS-CoV-2 infection on primary vaccination has gradually waned over time, being nearly completely lost after 8 months, after which baseline SARS-CoV-2 seropositive and seronegative people should then be considered a more homogenous population. A second possible explanation is that the immune system has probably achieved a maximum degree of stimulation, after which additional immunogenic triggers (either natural, like an infection, or artificial, such as COVID-19 vaccination), would not be effective to generate additional increases in the serum values of anti-SARS-CoV-2 spike trimeric IgG. This hypothesis is consistent with the fact that the humoral response elicited by excess of mRNA-based vaccines seems not proportional to the overdose, achieving a maximum level of anti-SARS-CoV-2 IgG values after which no additional enhancement is predictable (9).

Irrespective of the specific mechanism(s) underlying this biological evidence, the fact that a BNT162b2 booster dose elicits similar anti-SARS-CoV-2 antibodies response in baseline SARS-CoV-2 seropositive and seronegative individuals carries important clinical implications. First, the administration of booster vaccine doses would seem advisable also in baseline SARS-CoV-2 seropositive subjects, in that the immunological memory developed after an earlier SARS-CoV-2 infection may not last enough for allowing to safely avoid a vaccine single booster. This holds especially true considering that antibody-mediated neutralization of highly mutated SARS-CoV-2 lineages (such as Omicron) is considerably impaired (10) and, therefore, additional boosters would be highly recommended to prevent clinically unfavourable infections with emerging lineages. The second important evidence garnered from current and previous data (9), is that the booster dose seems actually effective to

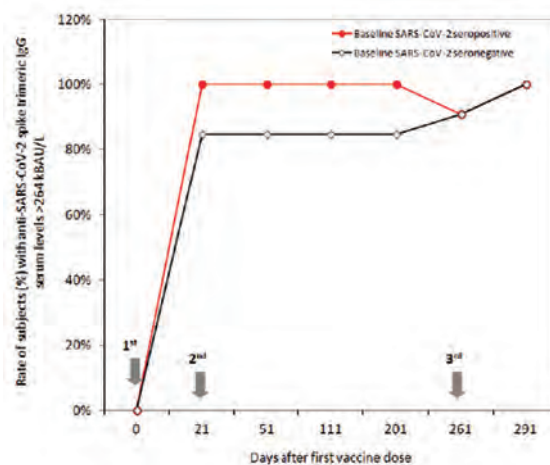


Figure 2

Rate of baseline SARS-CoV-2 seronegative ($n = 51$) and seropositive ($n = 11$) subjects with serum anti-SARS-CoV-2 spike trimeric RBD IgG antibodies levels > 264 kBAU/L. The gray arrows indicate the time of administration of the three mRNA-based BNT162b2 vaccine doses.

SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; RBD, Receptor Binding Domain.

trigger a maximum humoral response, with little further improvement expected by administering higher or additional doses in the short-term period. This calls for a major role of strict monitoring of anti-SARS-CoV-2 antibodies throughout and after vaccination, in that timely and accurate identification of subjects with more rapid and sharper decline of anti-SARS-CoV-2 antibodies titres would enable personalized administration of additional vaccine doses and proper rationalization of worldwide vaccine usage (11,12).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to the entire staff of the Pederzoli Hospital of Peschiera del Garda (Verona, Italy) for accepting to participate to this study.

CONFLICT OF INTEREST

None

REFERENCES

1. Mattiuzzi C, Lippi G. COVID-19 vaccines efficacy in preventing or limiting SARS-CoV-2 infections. *J Infect* 2022;31:S0163-4453(22)00051-2. doi: 10.1016/j.jinf.2022.01.033. Epub ahead of print.
2. Koelle K, Martin MA, Antia R, Lopman B, Dean NE. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. *Science* 2022;375:1116-21.
3. Puricelli C, Carnaghi B, Dianzani U, et al. SARS-CoV-2 and the new era of vaccines – Part II Currently available vaccines to fight the COVID-19 pandemic and the laboratory role in the vaccination campaign. *Biochim Clin* 2022;46:16-33.
4. Notarte KI, Ver AT, Velasco JV, et al. Effects of age, sex, serostatus, and underlying comorbidities on humoral response post-SARS-CoV-2 Pfizer-BioNTech mRNA vaccination: a systematic review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022;28:1-18. doi: 10.1080/10408363.2022.2038539. Epub ahead of print.
5. Salvagno GL, Henry BM, di Piazza G, et al. Anti-SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain Total Antibodies Response in seropositive and seronegative healthcare workers undergoing COVID-19 mRNA BNT162b2 vaccination. *Diagnostics (Basel)* 2021;11:832
6. Salvagno GL, Henry BM, Pighi L, et al. Longitudinal monitoring of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG antibodies after BNT162b2 vaccination in healthcare workers. *Biochim Clin* 2022;46:83-5.
7. Mahmoud SA, Ganesan S, Naik S, et al. Serological assays for assessing postvaccination SARS-CoV-2 antibody response. *Microbiol Spectr* 2021;9:e0073321.
8. Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27:2032-40.
9. Raposo F, Lippi G. Antibody response induced by the boost overdose during COVID-19 heterologous prime-boost vaccination strategy. *Clin Chim Acta* 2021;523:201-4.
10. Lippi G, Mattiuzzi C, Henry BM. Neutralizing potency of COVID-19 vaccines against the SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant. *J Med Virol* 2022;94:1799-802 doi: 10.1002/jmv.27575. Epub ahead of print.
11. Lippi G, Henry BM, Plebani M. Optimizing effectiveness of COVID-19 vaccination: will laboratory stewardship play a role? *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1885-8.
12. Lippi G, Mattiuzzi C. Il contributo della Medicina di Laboratorio nella campagna vaccinale anti COVID-19. *Biochim Clin* 2022;46:6-8.

La gestione del paziente in terapia anticoagulante orale in corso di pandemia: le soluzioni del Centro Emostasi e Trombosi di Savona

Cinzia Scarone, Veronica Dovere, Cristina Traverso, Flavia Lillo

Laboratorio di Patologia Clinica ASL 2 Regione Liguria

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso Nazionale SIBioC, 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, quale Comunicazione Orale

ABSTRACT

Monitoring of anticoagulant therapy during the COVID pandemic: the experience of the anti-thrombosis Centre in Savona (Italy).

Introduction: the health emergency caused by the COVID-19 pandemic has forced health providers to rethink and reformulate patients' care management, particularly during lockdown, in view of the need of stronger interactions between hospitals and local medical care with the aim of reducing the number of patients' accesses to the hospitals. Patient under oral anticoagulant therapy, particularly those treated with antivitamin K drugs (AVK), need continuous therapy monitoring and drug dose adjustment, thus increasing their risk of possible SARS-CoV-2 exposure during the visits to the hospitals. The aim of this study is to illustrate, using appropriate indicators, the outcomes of an alternative clinical management of anticoagulated patients, adopting a new organizational model and an extended use of digital tools.

Methods: a dedicated telephone number and a digital platform for therapy issuing were activated to maintain continuous patient surveillance and counselling activity. Specific indicators were: number of telephone calls received; number of digital therapy prescriptions; time in range (TTR) of AVK patients; number of major adverse events.

Results: during the pandemic phase 10215 telephone calls were received (with an increase of 200% compared to the pre-pandemic era). When compared to the values observed in the pre-pandemic period, the values of the indicators remained stable during the pandemic phase: TTR of AVK patients was 74% *versus* 74.6%; 22 minor and 2 major bleeding events were recorded *versus* 21 and 2 respectively.

Discussion: the results obtained show, from the patient side, an optimal acceptance of the model proposed and, from the clinical side, the maintenance of the pre-pandemic quality standards of care.

Parole chiave: COVID-19, terapia anticoagulante orale, sorveglianza antitrombosi

INTRODUZIONE

L'uso della terapia anticoagulante orale (TAO) ha registrato una grande espansione nel corso degli ultimi venti anni, grazie alle evidenze scientifiche circa l'efficacia di tali trattamenti nella riduzione del rischio di ictus (1-3).

I farmaci antagonisti della vitamina K (AVK) adottati da oltre 50 anni, sono probabilmente tra i farmaci più studiati nella pratica clinica.

Allo stesso tempo, l'uso di questi farmaci presenta diversi problemi gestionali, il che probabilmente ha contribuito ad una loro diffusione sub-ottimale: recenti dati epidemiologici italiani, in linea con quelli della letteratura internazionale, evidenziano come solo un terzo circa dei pazienti con fibrillazione atriale (FA) che in base alle Linee Guida correnti richiederebbero

trattamento anticoagulante, ricevono effettivamente questa terapia (4). Una prima problematica degli AVK è lo stretto intervallo terapeutico, per cui questi farmaci richiedono un regolare monitoraggio della coagulazione e una attenta gestione dei dosaggi e delle interazioni (farmaci e abitudini alimentari); questo può comportare disagi e oggettive difficoltà di accesso a tale terapia per alcune categorie di pazienti. Condizione indispensabile per ottenere i migliori risultati dalla TAO con AVK, è una buona gestione della stessa; più elevata è la percentuale del tempo in cui il paziente si trova all'interno dell'intervallo terapeutico, maggiori saranno le probabilità di successo del trattamento. Si considera che il miglior indice della qualità del trattamento sia il Time in Therapeutic Range (TTR), calcolato secondo le raccomandazioni della letteratura. Infine, studi retrospettivi hanno dimostrato

Corrispondenza a: Cinzia Scarone, Ospedale San Paolo S.C. Patologia Clinica via Genova 30 Savona (SV),
E.mail: c.scarone@asl2.liguria.it

Ricevuto: 17.02.2022

Revisionato: 04.03.2022

Accettato: 04.04.2022

Pubblicato on-line: 27.04.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.022

che un miglioramento del 7% del TTR riduce in modo significativo le emorragie maggiori e tale riduzione è quantizzabile in un evento in meno ogni 100 anni-paziente (5). Il monitoraggio della terapia può però offrire anche alcuni vantaggi in termini di personalizzazione della terapia. Infatti, pur nella necessità di garantire il mantenimento dell'intervallo terapeutico ottimale indicato dalla letteratura, è pratica clinica comune cercare di mantenere più vicini al suo limite superiore quei pazienti che si giudicano a rischio embolico più elevato e a basso rischio emorragico e viceversa.

Uno studio di confronto tra pazienti trattati con anticoagulanti orali seguiti in Centri TAO italiani, ha analizzato la popolazione seguita nel 1996 e a distanza di 20 anni, quella seguita nel 2016. Dai dati pubblicati emerge come nel 1996 solo il 16,8% dei pazienti in trattamento aveva come indicazione la fibrillazione atriale (FA), mentre nel 2016 i pazienti con FA rappresentavano il 61,6% del totale dei pazienti seguiti. Lo stesso studio dimostra come la popolazione in trattamento con anticoagulanti orali sia oggi molto più anziana che in passato, passando da un'età media di 63,6 anni a quella di 73,0 anni nel 2016, grazie anche all'avvento degli Anticoagulanti ad Azione Diretta (Direct Oral AntiCoagulant, DOAC) (6).

Nei soggetti in trattamento per FA l'età media è ancora più avanzata, come dimostrano numerosi studi di popolazione italiani, raggiungendo 75 anni nello studio ETNA-AF (Edoxaban Treatment in routine clinical practice - Atrial Fibrillation) (7) e 77 anni nello studio ATA-AF (8-9).

L'emergenza generata dalla pandemia da COVID-19 ha impegnato gli operatori sanitari, particolarmente durante la fase epidemica acuta, nella ricerca di modalità di assistenza alternative focalizzate, in particolare, su una maggiore interazione ospedale-territorio, con l'obiettivo prioritario di ridurre gli accessi dell'utente alle strutture sanitarie centralizzate.

I pazienti in TAO ed in particolare quelli in AVK, necessitando di un continuo monitoraggio per la gestione del dosaggio terapeutico (10-11), hanno un conseguente maggior rischio di esposizione a COVID-19 in occasione degli accessi ambulatoriali, rischio che può essere aggravato dall'età avanzata e dalla presenza di comorbidità.

Obiettivo di questo studio è la descrizione della soluzione da noi adottata al fine di definire un modello di assistenza integrato attraverso l'uso di strumenti digitali.

METODI

Presso la Struttura Complessa di Patologia Clinica dell'ASL 2 di Regione Liguria, da circa 20 anni è operativo un Centro TAO che dal 2012 è accreditato dalla Federazione dei Centri Sorveglianza Anticoagulazione (FCSA) come Centro Emostasi e Trombosi per il monitoraggio della TAO e per la consulenza sulle patologie coagulative.

Durante l'emergenza pandemica, in accordo con le linee guida di FCSA, sono stati rivalutati alcuni aspetti

che permettessero di:

- minimizzare i rischi di esposizione per il paziente in TAO con AVK o con DOAC;
- mantenere un ottimale supporto clinico/consulenziale, consentendo un accurato monitoraggio della aderenza del paziente alla terapia;
- gestire al meglio anche da remoto le emergenze sia emorragiche che trombotiche, al fine di ridurre gli accessi in Pronto Soccorso (ove possibile) e alle strutture ospedaliere.

Pazienti

Nell'aprile 2021, i pazienti in carico al Centro Trombosi dell'Ospedale San Paolo di Savona (FCSA 123) sono in totale 781: il 59,5% con diagnosi di FA, il 18,3% per la presenza di protesi valvolari meccaniche ed il 17,2% per patologie trombotiche quali trombosi venose profonde (TVP) ed embolie polmonari (EP), il 5% sono pazienti con eventi di tipo trombotico e arteriopatico di diversa eziologia rispetto alle precedenti. Ad oggi i pazienti in DOAC sono 560, rispettivamente dabigatran (n=96), rivaroxaban (n=206), edoxaban (n=104), apixaban (n=154), mentre i pazienti in AVK sono 221 (Tabella 1).

In epoca pre-pandemica l'accesso del paziente TAO al servizio era governato nell'ambito della normale routine dei percorsi ambulatoriali (accesso diretto o su prenotazione), della accettazione amministrativa, della raccolta e valutazione della documentazione clinica (foglio terapia, eventuali referti di visite o ricoveri). Al prelievo, a cura di personale infermieristico specificamente formato, seguivano tutte le informazioni relative all'operatività del Centro. Un medico del Centro è sempre stato a disposizione con funzione di presa in carico e consulenza. Il referto cartaceo del risultato dell'INR (International Normalized Ratio) veniva normalmente ritirato dall'utente allo sportello insieme al foglio di terapia. Ciò comportava lo stazionamento dell'utente presso la struttura per almeno 30-45 minuti.

Gestione emergenza COVID-19

Durante la pandemia è stato attivato un numero di cellulare dedicato, attivo dalle ore 8 alle 20, dal lunedì al sabato, dotato di un servizio di messaggistica vocale. Ad ogni paziente è stato richiesto di aderire attraverso un consenso informato alla gestione informatizzata della terapia TAO fornendo un indirizzo email per l'inoltro di documenti sanitari tramite posta elettronica.

Indicatori

Al fine di valutare l'efficacia dell'intervento di riorganizzazione dell'assistenza sono stati identificati i seguenti indicatori:

- numero di chiamate in entrata sul telefono dedicato;
- numero di piani terapeutici rilasciati per DOAC;
- tempo trascorso all'interno dell'intervallo terapeutico per pazienti in AVK;
- numero di complicanze registrate nel periodo in esame;

- numero di accessi al Centro in ospedale (anno 2020).
I periodi presi in esame sono stati: aprile 2019-marzo 2020 (periodo pre-pandemico) e aprile 2020-marzo 2021 (periodo pandemico).

RISULTATI

La Tabella 1 descrive la popolazione in carico presso il Centro suddivisa per patologia e per terapia anticoagulante somministrata ad aprile 2021. La tipologia di popolazione e la terapia non differiscono nei due periodi confrontati.

Nella Tabella 2 sono descritti gli eventi avversi registrati nel periodo in esame e nel medesimo periodo pre-pandemia.

La Tabella 3 riassume i valori di tutti gli indicatori utilizzati.

Il numero di telefono dedicato al Centro TAO, attivo in era pre-pandemica con una disponibilità di 6 ore giornaliere (8.00-14.00) è stato reso disponibile per 12 ore al giorno, come sopra specificato, al fine di supportare l'utenza ed i medici curanti, anche rispetto ai molti dubbi e timori suscitati dalla pandemia.

Durante il periodo in esame sono state registrate 10 215 chiamate, a fronte di quelle registrate nel 2019 pari a 2190 con una media di 30 chiamate al giorno confrontato con una media ≤ 10 nel medesimo periodo in era pre-pandemica. I risultati riportati in Tabella 3 mostrano una sostanziale sovrapposizione di valori tra quelli registrati in periodo pre-pandemico e quelli

Tabella 1

Pazienti afferenti al Centro FCSA 123 dell'ASL2 di Regione Liguria ad aprile 2021, suddivisi per patologia e tipo di terapia somministrata

Patologia di base	DOAC (%)	AVK (%)	Totale (%)
Protesi valvolare meccanica	-	143 (65)	143 (18,3)
Trombosi (TVP o EP)	135 (24)	-	135 (17,2)
Fibrillazione Atriale	420 (75)	45 (20)	465 (59,5)
Altro*	5 (1)	33 (15)	38 (5)
Totale	560	221	781

FCSA, Federazione dei Centri di Sorveglianza Anticoagulazione; DOAC-Direct-Acting Oral Anticoagulants – Anticoagulanti Orali d'Azione Diretta; AVK, farmaci anti-vitamina K; TVP, trombosi venosa profonda; EP, embolia polmonare.

** Sindrome da anticorpi antifosfolipidi; Infarto mesenterico; Ipertensione polmonare*

Tabella 2

Pazienti afferenti al Centro FCSA 123 in epoca pre-pandemica e in pandemia

Evento	Pre-pandemia	In pandemia
Piccole emorragie	21	22
Emorragie maggiori	2	2
Decessi	1	2
Altro*	2	4
Totale	33	35

** Ricoveri non sicuramente riconducibili a Terapia Anticoagulante Orale.*

Tabella 3

Risultati degli indicatori

	Valori in pre-pandemia	Valori in pandemia	Scostamento %
Numero di telefonate giornaliere in entrata	10 al giorno	30 al giorno	+200
Numero di piani terapeutici rilasciati per DOAC	143	160	+11
TTR in AVK (%)	74,6	74	invariato
Eventi avversi emorragici maggiori	2	2	invariato
Piccole emorragie	21	22	invariato
Accessi in presenza	5691	4260	-25

DOAC, Direct-Acting Oral Anticoagulants – Anticoagulanti Orali d'Azione Diretta; TTR, Tempo in Range Terapeutico; AVK, farmaci anti-vitamina K.

registrati durante la pandemia, dimostrando l'efficacia della modalità di assistenza applicata nel mantenere lo standard assistenziale.

In particolare, il TTR dei pazienti in AVK è stato del 74% in periodo pandemico e sono stati registrati 22 eventi avversi emorragici tra cui due eventi emorragici maggiori; questi valori sono del tutto sovrapponibili a quelli registrati in periodo pre-pandemico (Tabella 2 e Tabella 3).

DISCUSSIONE

La maggior parte dei pazienti in TAO si colloca nella fascia di età ≥ 65 , per i quali, al fine di ridurre il rischio di contagio da SARS-CoV-2, sussiste l'indicazione ad evitare accessi non indispensabili al Pronto Soccorso ed alle strutture sanitarie in genere; tali accessi, infatti, si potrebbero evitare nel 15% dei casi (12). Il rischio è significativamente più elevato nei pazienti più anziani ed in politerapia ed è correlato alle condizioni sociali ed all'efficacia del coordinamento dei servizi di cura nella continuità ospedale-territorio.

La scelta della somministrazione di un trattamento DOAC o AVK è legata alle competenze e professionalità di aree specialistiche (cardiologi, internisti, esperti in emostasi) unite alla conoscenza delle caratteristiche anamnestiche di ciascun paziente: co-somministrazione di terapie farmacologiche, storia clinica, comorbidità, nonché possibilità di aderenza al trattamento (13-14)

La personalizzazione della terapia, particolarmente del soggetto in AVK richiede una accurata valutazione del rischio trombo-embolico ed emorragico individuale ed è necessario uno stretto monitoraggio clinico e di laboratorio per cogliere tempestivamente variazioni che richiedano una rivalutazione del tipo e/o del dosaggio del farmaco anticoagulante (15-16). Gli eventi avversi osservati (sanguinamenti maggiori o minori e decessi), si sono verificati proprio in pazienti in trattamento con AVK e come dimostrato dai dati ottenuti, il numero di tali complicanze risulta sovrapponibile nei periodi considerati: pre-pandemia e durante la pandemia. Il Centro si è dimostrato in grado di seguire e monitorare tutti i pazienti, che sono rimasti invariati in termini numerici.

In particolar modo, si è garantita la compliance del trattamento con AVK, adeguando le risorse e la funzionalità al particolare periodo pandemico.

Riguardo il verificarsi di eventi avversi sui pazienti in trattamento anticoagulante, è opportuno rilevare quanto segue. Relativamente al periodo in esame, in questo studio (aprile 2020–marzo 2021), le complicanze cliniche non si sono verificate in soggetti che avevano contratto infezione da SARS-CoV-2 durante le prime due ondate dell'infezione pandemica. Queste, tuttavia, sembrano aver avuto un impatto maggiore durante la terza ondata di infezione (dati non pubblicati): la valutazione di questo fenomeno sarà oggetto di futuro e ulteriore approfondimento.

La nuova organizzazione, indotta dall'esigenza di far fronte alle difficoltà di sorveglianza dei pazienti in tempo di pandemia, ha permesso di mantenere invariata l'aderenza alla terapia TAO, scopo fondamentale dell'esistenza del

Centro, ed ha riscosso un elevato livello di gradimento da parte dei pazienti che hanno valutato positivamente la possibilità di mantenere il contatto continuo con il clinico di riferimento evitando nel contempo faticosi e rischiosi accessi alla struttura ospedaliera.

Inoltre, l'invio dei referti e dei piani terapeutici per via informatica ha permesso di ottimizzare le risorse, riducendo il carico di attività del personale amministrativo, permettendo al paziente l'accessibilità ai propri documenti sanitari senza limiti di orario.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano per il supporto il personale tecnico del Settore Coagulazione del Laboratorio di Patologia Clinica ed il personale infermieristico dell'Ambulatorio Prelievi dell' Ospedale San Paolo di Savona.

BIBLIOGRAFIA

1. Palareti G, Leali N, Coccheri S, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment an inception – cohort,prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet* 1996;348:423-8.
2. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, et al. Oral anticoagulant Therapy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis,9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2012;14 Suppl 2:Se88.
3. Ayalew MB, Tegegn HG, Abdela OA. Drug Related Hospital Admissions: A Systematic Review of the Recent Literatures. *Bull Emerg Trauma* 2019;7:339–46.
4. Mazzaglia G, Filippi A, Alacqua M, et al. A national survey of management of atrial fibrillation with antithrombotic drugs in Italian primary care. *Thromb Haemost* 2010;103:968-75.
5. Wan Y, Heneghan C, Perera R, et al. Anticoagulation control and prediction of adverse events in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2008;1:84-91.
6. Palareti G, Antonucci E, Migliaccio L, et al. (centers participating in the FCSA-START-Register;the ISCOAT 2016 study: Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy-2016). Vitamin K antagonist therapy: changes in the treated populations and in management results in Italian anticoagulation clinics compared with those recorded 20 years ago. *Intern Emerg Med* 2017;12:1109-19.
7. Riva, Di Pasquale G. New oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation: efficacy and safety data from the real world. *G Ital Cardiol* 2017;18:188-98.
8. Di Pasquale G, Mathieu G, Maggioni AP, et al. ATA-AF Investigators. Current presentation and management of 7148 patients with atrial fibrillation in cardiology and internal medicine hospital centers: the ATA AF study. *Int J Cardiol* 2013;167:2895-903.
9. Riva L, Gussoni G, Maggioni AP, et al. Persistenza alla terapia anticoagulante orale nei pazienti italiani affetti da fibrillazione atriale: lo studio ATA AF. *G Ital Cardiol* 2014;15 Suppl 4:Se6
10. Guida alla terapia con anticoagulanti orali FCSA ed. 2019 e 2020. www.fcsa.it (ultimo accesso: marzo 2022).
11. Poli D, Antonucci E, Testa S, et al. Bleeding risk in very

- old patients on vitamin K antagonist treatment: results of a prospective collaborative study on elderly patients followed by Italian Centers for Anticoagulation. *Circulation* 2011;124:824-9.
12. Agenzia Regionale di Sanità (ARS) della Regione Toscana, 2019. www.ars.toscana.it (ultimo accesso: marzo 2022).
 13. Steffel J, Verhamme P, Potpara TS, et al. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2018;39:1330-93.
 14. Kearon C, Akl EA, Camerota AJ, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:Suppl 2:Se419-94.
 15. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2014;383:955-62.
 16. Larsen TB, Skjøth F, Nielsen PB, et al. Comparative effectiveness and safety of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants and warfarin in patients with atrial fibrillation: propensity weighted nationwide cohort study. *BMJ* 2016;353:i3189.

Shallow Whole Genome Sequencing (sWGS) pipeline for the assessment of Homologous Recombination Deficiency (HRD) score in Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) patients

Giovanni Luca Scaglione^{1,2}, Carmela Nardelli^{1,3}, Mario Setaro¹, Filippo Russo^{1,3}, Ettore Domenico Capoluongo^{3,4}

¹Oncogenomics Laboratory, CEINGE - Biotecnologie Avanzate - Franco Salvatore, Naples, Italy

²Istituto Dermatologico dell'Immacolata, IDI-IRCCS, Rome, Italy

³Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of studies of Naples Federico II, Naples, Italy

⁴Hospital for Emergency Cannizzaro, Catania, Italy

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso Nazionale SIBioC, 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, quale Comunicazione Orale

ABSTRACT

Introduction: the Homologous Recombination Repair (HRR) system is essential for DNA repair and genomic stability. Homologous Recombination Deficiency (HRD) arises upon the inactivation of several genes involved in HRR, and it is commonly observed in breast and ovarian cancer. The detection of HRD is a valuable tool of clinical relevance, indicative of sensitivity to agnostic therapy and DNA damaging reagents.

Methods: shallow Whole Genome Sequencing (sWGS) was performed on 26 ovarian cancer (OC) samples divided into training (n=13) and test group (n=13). The training set included 7 somatic and 6 germline carrying BRCA+ve (n=8) and BRCA-ve (n=5) status. In particular, the BRCA+ve were 3/7 somatic and 5/6 germline samples; the BRCA-ve were 4/7 somatic and 1/6 germline. All samples were prepared using the KAPA HyperPlus Library Preparation kit (Roche), pooled and sequenced on NextSeq550 Dx (Illumina). Large-Scale Transitions (LST) profiles were calculated using WGS data at low coverage (<1x) using different sliding window sizes spanning 10-1 000 Kbases. The HRD score was estimated using our bioinformatics pipeline.

Results: the BRCA status was assessed in 22/26 OC samples, and the HRD score was evaluated in all somatic samples. In the test group, 7 BRCA+ve samples were classified as HRD+ve, 2 BRCA-ve were classified as HRD-ve, and 4 BRCA unknown samples were predicted as HRD+ve in two cases and HRD-ve in the other half.

Discussion: germline BRCA1/2 mutation status is currently the main genetic biomarker of HRD, but it has its drawbacks: HRD can be driven purely by somatic events. A bioinformatics pipeline to evaluate the HRR system status in breast and ovarian cancer has been completed; it is based on sWGS to support therapeutics and follow up strategies.

Key words: Homologous Recombination Deficiency (HRD), Shallow Whole Genome Sequencing (sWGS), Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC)

INTRODUCTION

DNA Damage Repair (DDR) pathways act to protect the genome of human cells from mutational insults. Cancer development is a multifactorial process and comprises key events such as the inability to control cellular replication, angiogenic infiltration, invasion activation, and metastasis formation (1). The genomic instability is due to genetic mutations affecting the DNA directly or to errors in the DNA damage repair system. One of the most frequently altered DDR pathways in ovarian and breast cancer is the homologous recombination (HR) system (2). This is a double-strand DNA breaks repairing

mechanism, a relatively error-free mechanism because it is based on the presence of intact sister chromatids that guide the repair of the damaged portion of DNA (3). This high-fidelity DNA double-strand break (DSB) repair system involves numerous genes, including *BRCA1* and *BRCA2* (4). HR pathway deficiency (HRD) arises upon inactivation of genes; among these, *BRCA1/2*, *RAD51C* or *PALB2* are associated with several tumors that are characterized by the presence of the genomic scars related to HRD-tumors (3):

- Large-Scale State Transitions (LSTs), chromosomal breaks between adjacent regions of at least 10 Mbase;

Corresponding Author: Giovanni Luca Scaglione, Via dei Monti di Creta, 104, Rome, Italy, E.mail: g.scaglione@idi.it

Riceved: 01.02.2022

Revised: 23.02.2022

Accepted: 08.04.2022

Published on-line: 22.04.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.023

- Telomeric Allelic Imbalance (TAI), defined as the number of regions with an allelic imbalance that extends to the sub-telomere but does not cross the centromere;
- Loss Of Heterozygosity (LOH) indicates when one of the two alleles originally present in the cell is lost.

These structural aberrations could be measured to provide a powerful score reflecting genomic instability in cancer cells (5). Marquard et al. (6) have extensively studied Cancer Genome Atlas (TCGA) samples to evaluate the potential clinical significance of these genomics scars in several tumor types. These Authors reported that TAI and LSTs generally correlate with each other (Spearman's $\rho=0.87$), with $\rho>0.7$ in 8 of 15 cancer types. LOH shows a lower level of correlation with both TAI ($\rho=0.81$) and LST ($\rho=0.73$). TAI and LST measure overlapping genomic scars and give high scores to more similar subpopulations of tumors. In contrast, the lower correlation to LOH suggests that it is counting genomic scars of a somewhat separate tumor subpopulation. Moreover, it is shown that the high correlation between TAI and LST is not caused by an overlap in the individual events counted. Instead, the high correlation indicated that the underlying repair defect generates multiple complex genomic aberration patterns. The different methods rely on capturing different non-overlapping aspects of these patterns to estimate the overall DNA repair competency (6).

Recognizing that these distinctive genomic scars have an important clinical impact because the HRD tumors respond more efficiently to targeted therapy with poly ADP-ribose polymerase inhibitors (PARPi) and DNA damaging reagents (7,8). Identifying these alterations at the somatic level and the germline could thus provide major support in the therapeutic choice.

Based on all these considerations, our study aimed to perform a shallow sequencing protocol followed by the identification and enumeration of one specific genomic scar, namely LSTs, to outline an HRD profile, trying to address HRD-related target therapies as widely indicated, wherever applicable, by the current guidelines for agnostic therapy.

METHODS

Sample preparation

DNA samples from 26 women affected by ovarian carcinoma were collected after obtaining written informed consent and included in this study to evaluate the workflow. The samples were divided into two subsets as training and test groups. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Naples Federico II. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. The patients expressed their informed consent and authorization to anonymously use their biological material for diagnostic and scientific research purposes. The training group consisted of 13 DNA samples extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) ovarian carcinoma tissues. Among

these, ten somatic samples were previously genotyped for *BRCA1/2* genes by an external center and then enrolled by our laboratory for shallow sequencing. The other 3 samples were genotyped in our laboratory using the 12 genes panel for *HBOC* genes (Devyser AB, Stockholm, Sweden). The training group included both germline ($n=6$) and somatic ($n=7$) samples previously genotyped for both *BRCA1/2* and *HBOC* genes. The somatic samples were 4 *BRCA-ve* and 3 *BRCA+ve*. The germline samples were 1 *BRCA-ve* sample and 5 *BRCA+ve*. The somatic DNA of 19 samples was isolated using the QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). The 6 germline samples were extracted using the MagPurix Blood DNA Extraction kit 200 (Zinexts Life Science - Taiwan). The quality of the nucleic acid was estimated using the TapeStation system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) followed by quantification on Qubit® Fluorometer 4.0 (Invitrogen Co., Life Sciences, Carlsbad, USA), by using both Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) or BR (Broad Range) assays for FFPE and germline respectively.

Library preparation

The DNA libraries were prepared using the KAPA HyperPlus kit (Roche Sequencing Solutions, Pleasanton, CA, US). According to the manufacturer's protocol, the DNA libraries were prepared at a final concentration of 50 ng/ μ L. Quality and integrity checks of the libraries were performed with the TapeStation system. Finally, the library concentration was measured using a high sensitivity Qubit dsDNA HS assay kit on Qubit® Fluorometer 4.0, after the equimolar pooling step of all samples included in the Next Generation Sequencing (NGS) run. The pool was loaded to a final concentration of about 1.2 pM and 2% Phix. The parallel sequencing step was performed using the NextSeq500/550 Mid output kit (300 cycles) on the Illumina NextSeq550 Dx (Illumina, San Diego, CA, USA) platform RUO mode.

Bioinformatics analysis

The performance of the NGS run was evaluated with the Illumina Run Manager installed on the instrument. Quality checks of sequencing data were performed with MultiQC software (9). The Fastq files were aligned to the GRCh37/hg19 assembly of the human reference genome using BWA-MEM algorithm (10). Moreover, supplementary and duplicate reads were filtered with Samtools and PicardTools' MarkDuplicates, respectively. To detect biases in the sequencing and/or mapping steps, all Binary Alignment Map (BAM) files were evaluated with the platform-independent tool Qualimap (11). Circular binary segmentation on the aligned files was performed using different window sizes using the QDNAseq tool (12,13). Downstream analysis of our bioinformatics tool performed data normalization and dynamic coverage calculation throughout the entire genome (WGS data) with very low depth in several fixed bins. The algorithm scans for copy number alterations in each chromosome in a range of preset windows bins. The available range is

10-1000Kb. After reads normalization, genomic regions affected by LSTs are filtered and collected. An HRD score is assigned to each sample in 6 different windows bins at this stage. Finally, the segmentation profiles are processed, and the number of LSTs calculated in each genome window is integrated in a unique result for the HRD classification. Three possible outcomes are available: HRD negative, HRD positive, or Undetermined when the algorithm cannot classify the HRD status.

RESULTS

The NGS protocol for shallow sequencing was optimized to preserve somatic DNA available in very small amounts, as it was extracted from FFPE samples. At the same time, we tried to avoid unnecessary high read coverage, thus allowing more samples per run to be loaded. The first run was loaded with 16 samples on the NextSeq 550 Dx using the Mid output kit described in the Methods section. In the subsequent runs, we fixed the number of samples per run to 50 to preserve coverage to be not lower than 0.4x. Shallow WGS was performed on both DNA isolated from FFPE sections and the blood samples (germline). The average coverage for each sample was expected to be lower than 1x. Therefore, the entire protocol was optimized to obtain a final coverage between 0.4x and 0.6x of genomic fraction covered. This was a sufficient criterion to allow a good performance of the algorithm. Once the samples were sequenced and quality checks performed on the fastq, raw reads were aligned against the hg19 human reference. The coverage profiles were then inspected with Integrative Genomics Viewer (14), as shown in Figure 1. The picture shows coverage data in a small genomic region for 3 randomly selected samples sequenced by our sWGS protocol. This tool makes possible to highlight the discontinuity of the genomic fractions covered as expected in the shallow NGS mode. For each sample, the overall coverage profile was evaluated and inspected. A detailed view of the coverage profile is shown in Figure 2. Here the coverage across the entire reference is shown as a continuous red line through all chromosomes in consecutive order from left to right. The genome fraction coverage for all the samples

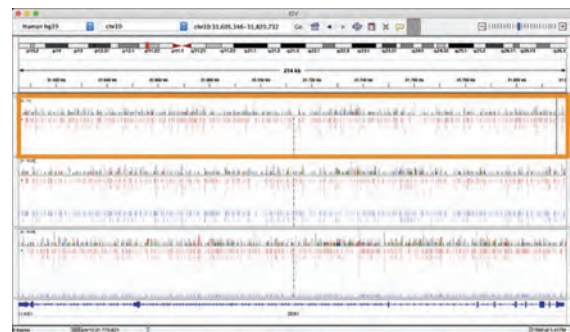


Figure 1
Integrative Genomics Viewer (IGV) profiles of a genetic spot (chr10:31,605,346-31,820,732) sequenced in 3 shallow Whole Genome Sequencing (sWGS) samples sequenced on Illumina NextSeq550DX. The figure shows coverage data in a small genomic region of 3 random samples sequenced using the shallow Next Generation Sequencing (sNGS) protocol. The coverage profiles are examined with Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, University of California). The orange box highlights the overall coverage profile in a single sample reflecting the discontinuity of the genomic fractions covered (as foreseen by shallow Whole Genome Sequencing modality).

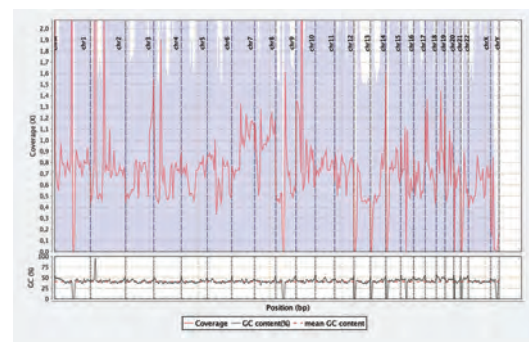


Figure 2
Coverage Across Human Reference. Overview of a coverage profile using Qualimap tool (11) of a sample analyzed with our shallow Whole Genome Sequencing (sWGS) protocol. From left to right, the average coverage across the entire reference is shown as a continuous red line through all chromosomes (dashed horizontal lines).

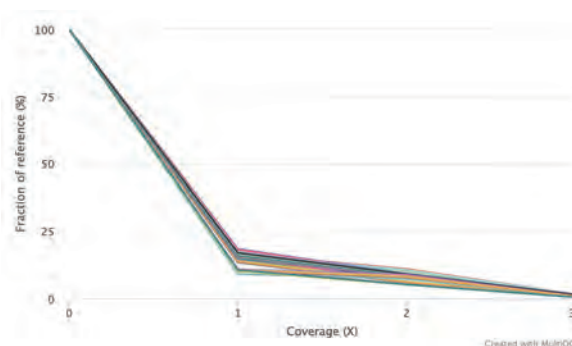


Figure 3
Genome Fraction Coverage. Aligning all the Binary Alignment Map (BAM) files, it is possible to analyze the genomic instability as Large-Scale Transitions. As shown in the figure, comparing the results in terms of Coverage (X) and Fraction of reference (%), there is a strong similarity between all the samples (each represented with different colored lines) in terms of the covered genome fraction. The plot was extracted from Qualimap report (11).

is shown in Figure 3. This is a visual representation of how much reference has been sequenced with at least a given coverage rate (9) and remarks the high similarity among different samples in terms of fraction of genome covered.

All the aligned BAM files were then processed to study the genomic instability in terms of large-scale transitions. The R package QDNAseq (13) was used to investigate these chromosomal aberrations. Finally, the HRD prediction was performed using our bioinformatics pipeline. Training samples (n=13) were used to set the thresholds for the HRD scoring algorithm. In the training set, one “undetermined” sample, for whom HRD prediction was not measured, was intentionally included to evaluate the performance of our classifier in this possible scenario. For each model, three values are calculated and reported as: negative (indicated with “0”), potentially positive (indicated with “1”) or positive sample (indicated with “2”). In Table 1, the classification score coupled with the model's predictions for both the training and the test group is shown. In the training group, we analyzed 13 known samples: 1 undetermined sample, 10 negative samples, both somatic and germline, and 2 positive samples with confirmed HRD status. The algorithm performed well in all the 13 cases in the test group, as no one was classified as undetermined. We reported 4 samples as negative and 9 samples as positive for HRD.

Interestingly, these results were successively compared with *BRCA* status when available. Indeed, we found 10 out of 13 samples matching the *BRCA* status and HRD score. Specifically, 8 out of 9 s*BRCA*+ve samples were also HRD positive, and 2 s*BRCA*-ve samples were found as HRD negative. The remaining 3 samples were not genotyped before the sWGS protocol for *BRCA*, so we could not compare these results. As expected, all the germline samples in the training group were HRD negative.

DISCUSSION

Carcinogenesis is the sum of several events provoking the accumulation of many malignant features in cells, such as the ability of unlimited replication, the induction of angiogenesis, and the activation of invasion and metastasis. These events are mainly caused by genomic instability arising from genetic mutations (16). Generally, DNA damage response mechanisms, also called DNA Damage Repair pathways (DDRs), can protect the genome from mutational stimuli. Among these, the two pivotal repair mechanisms against DNA double-strand breaks (DSB) are the homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end-joining (NHEJ). One of the most frequently impaired DDR pathways in cancer cells is the homologous recombination repair (HRR). The loss of the HRR activity, namely Homologous Recombination Repair Deficiency or HRD, is caused by somatic or germline mutations in those genes that are principally involved in the repair of DSBs, especially *BRCA1/2* or *PALB2*. The HRD appears to be one of the most dangerous mechanisms involved in cancer development. When this repairing mechanism

is lost, the cell primarily adopts a NHEJ pathway that is an error-prone system that increases genomic instability in cancerous cells (17). In literature, both *BRCA1* and *BRCA2* mutations are described as the most associated with pathogenic alteration in HRR (18).

According to data reported in several studies (like the PAOLA-1 study) (1), HRD positivity was approved as a new biomarker for the stratification of patients with high-grade epithelial ovarian cancer due to excellent results in maintenance therapy obtained from the combined administration of Olaparib and Bevacizumab (19). Furthermore, the use of new-generation drugs that inhibit the activity of poly-ADP-ribose-polymerase (PARPi) has shown very high efficacy, especially in *BRCA*-mutated tumors. The PARP1 and PARP2 enzymes are involved in the repair mechanisms of single-stranded DNA damage by adding long poly-ADP-ribose chains. Cells with HRD take advantage of NHEJ repair mechanisms more frequently, thus leading to an accumulation of damage at the genomic level. For this reason, PARP inhibition is particularly effective if the cell has a deficiency in the HRR system (20). Initially, PARPi were reserved for germline *BRCA1* and *BRCA2* positive patients, but today it is possible to extend the list of HRD-tumors in which these two genes are not mutated (20). This means that the identification of genomic instability, even if not linked to *BRCA* alterations, should be used as a biomarker in response to PARP inhibition.

One of the main mechanisms of carcinogenesis consists of a type of structural alteration at the chromosomal level, also known as Copy Number Variations (CNVs) (21,22). The gold standard for distinguishing CNVs has been committed to using a genome-wide comparative genomic hybridization array (aCGH) (23). Array-CGH is currently the most widely used technique. It compares the hybridization intensity of a DNA sample and a matched reference DNA, using oligonucleotide probes on a slide (23). This technique requires high-quality input DNA (13), thus limiting its application to somatic samples. The DNA extracted from FFPE tissue could be degraded, and formalin fixation could induce nucleotide changes. So, the use of FFPE-samples leads to an increase in the background noise with a consequently altered interpretation of the results (24,25).

An alternative technique is the detection of CNVs by means of shallow whole-genome sequencing (sWGS), a sequencing method based on the number of aligned reads within chromosomal windows. This sequencing protocol requires a very low genomic coverage (0.1-1.0x) (12), and it has been demonstrated that the diagnostic and clinical significance of sWGS is comparable to the use of aCGH (26,27). Furthermore, this approach has three advantages: cost reduction, reference-free analysis, and lower analytical background noise (13). These features result from accurate computational corrections coupled with analyses implemented in well-established bioinformatics workflows and alignment algorithms (28).

As mentioned above, it is essential to define specific genomic signatures that can reflect the genomic instability of tumor cells. Among the three types of genomic scars

Table 1

Homologous Recombination Deficiency (HRD) score prediction using the six integrated models included in our bioinformatics pipeline

Sample ID	Sample Type	BRCA status	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6	HRD Prediction
Training_01	Somatic	Negative	0	2	0	0	1	0	Undetermined
Training_02	Somatic	Positive	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_03	Somatic	Negative	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_04	Somatic	Positive	2	2	2	2	2	2	Positive
Training_05	Somatic	Negative	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_06	Somatic	Positive	1	2	2	2	2	2	Positive
Training_07	Somatic	Negative	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_08	Germline	Positive	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_09	Germline	Positive	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_10	Germline	Negative	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_11	Germline	Positive	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_12	Germline	Positive	0	0	0	0	0	0	Negative
Training_13	Germline	Positive	0	0	0	0	0	0	Negative
Test_01	Somatic	NA	0	0	0	0	0	0	Negative
Test_02	Somatic	NA	0	1	1	1	1	1	Positive*
Test_03	Somatic	NA	0	0	0	0	0	0	Negative
Test_04	Somatic	Positive	2	2	2	2	2	2	Positive
Test_05	Somatic	Positive	1	2	2	2	2	2	Positive
Test_06	Somatic	NA	1	1	1	2	1	1	Positive*
Test_07	Somatic	Positive	2	2	2	2	2	2	Positive
Test_08	Somatic	Positive	2	2	2	2	2	2	Positive
Test_09	Somatic	Positive	2	2	2	2	2	2	Positive
Test_10	Somatic	Positive	2	1	2	1	2	2	Positive*
Test_11	Somatic	Negative	0	0	0	0	0	0	Negative
Test_12	Somatic	Negative	1	0	0	0	0	0	Negative
Test_13	Somatic	Positive	0	2	2	2	2	2	Positive

Training samples (n=13) were used to set the thresholds for Homologous Recombination Deficiency (HRD) scoring algorithm. Notably, sample 'training_01' was intentionally included to evaluate performance in case of undetermined samples in our classifier. The three available outcomes calculated by each model are color coded: white cells: negative sample (0); light gray cells: potentially positive sample (1); dark gray cells: positive sample (2).

"NA": BRCA status not available.

The Homologous Recombination Deficiency (HRD) prediction (rightmost column) is obtained by combining direct annotation and Homologous Recombination Deficiency (HRD) score calculated by means of the ensemble learning method (machine learning module) included in our pipeline. When strong evidence of positive Homologous Recombination Deficiency (HRD) score was not available, the prediction is reported with a 'starred' text (positive).*

associated with HRD-tumors (3), namely LSTs, TAI and LOH, in this study, we applied and evaluated a bioinformatic pipeline based on LST metrics only that has shown promising performances, despite the absence of TAI and LOH measurements. This scenario analyzed 13 samples (to train our algorithm) and 13 germline and somatic test samples sequenced with sWGS workflow. HRD prediction comes from the combination of direct annotation and HRD score calculated with a machine learning module included in our pipeline. We reported “positive” or “negative” patients for HRD in the presence of strong evidence; otherwise, the prediction was flagged with a star (“positive*”). As shown in Table 1, HRD status is reported in association with the models’ predictions, confirming how the algorithm performed well in all the 13 tested samples. Indeed, no “HRD undetermined” predictions were reported. In our study, 7 previously genotyped subjects as BRCA positive (see Table 1) were classified as HRD positive by our bioinformatics pipeline. Specifically, 6 cases had strong evidence of positivity. In contrast, 1 case was reported as a borderline according to the prediction criteria included in our tool, and each sample is independently classified according to the level of agreement of the 6 build-in independent models. Strong evidence is assigned when at least 5 models return the same value. So, for the following samples: Test_04, Test_7, Test_08 and Test_09, we had strong evidence of positivity as the 6 models always assigned “2” as a result. Samples Test_05 and Test_13 were collected up to 5 times ‘2’ only but still considered strongly positive. On the other hand, sample Test_10 has collected 4 times ‘2’ and 2 times ‘1’; therefore, it has been classified as borderline. To classify as negative samples, we must collect 5 or more zeros, as for samples Test_03 and Test_11. Notably, these 2 patients were BRCA negative.

Moreover, 4 samples with no *BRCA* information were also analyzed with our pipeline. Test_01 and Test_03 were classified as HRD negative with 6 out of 6 zeroes as a model outcome. Additionally, our software classified Test_02 and Test_06 as borderline as they collected 5 times ‘1’ as an outcome.

Finally, there is evidence supporting the possibility of studying relevant genomic aberrations starting from sWGS protocols (13) that reduce costs in the field of molecular diagnostics and allow sequencing of low-quality DNA, such as the one deriving from paraffin-fixed samples. In this scenario, our pipeline is a robust, lightweight, and reliable front-runner diagnostic strategy tailored to identify genomic instability in a *BRCA*-independent manner. Nevertheless, we are aware of the limitations due to the small sample size. Therefore, to enforce our pipeline as a putative diagnostic tool, we are planning to increase the number of samples and the tumor types that should be evaluated with our workflow. Furthermore, our efforts are pointed to define a valid statistical framework to fully comply with the clinical and experimental application of this process. In conclusion, despite some amendable flaws can be recognized, we are herein proposing our pipeline as a further diagnostics tool for patient’s care in HBOC syndrome.

REFERENCES

1. Wagener-Rydzek S, Merkelbach-Bruse S, Siemanowski J. Biomarkers for homologous recombination deficiency in cancer. *J Pers Med* 2021;11:612.
2. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol* 2020;84:106535.
3. van Wilpe S, Tolmeijer SH, Koornstra RHT, et al. Homologous recombination repair deficiency and implications for tumor immunogenicity. *Cancers (Basel)* 2021;13:2249.
4. Nguyen L, Martens JW, Van Hoeck A, et al. Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. *Nat Commun* 2020;11:5584.
5. De Luca XM, Newell F, Kazakoff SH, et al. Using whole-genome sequencing data to derive the homologous recombination deficiency scores. *NPJ Breast Cancer* 2020;6:33.
6. Marquard AM, Eklund AC, Joshi T, et al. Pan-cancer analysis of genomic scar signatures associated with homologous recombination deficiency suggests novel indications for existing cancer drugs. *Biomark Res* 2015;3:9.
7. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of Pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* 2020;38:1-10.
8. Stover EH, Fuh K, Konstantinopoulos PA, et al. Clinical assays for assessment of homologous recombination DNA repair deficiency. *Gynecol Oncol* 2020;159:887-98.
9. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 2016;32:3047-8.
10. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-60.
11. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015;32:292-4.
12. Smolander J, Khan S, Singaravelu K, et al. Evaluation of tools for identifying large copy number variations from ultra-low-coverage whole-genome sequencing data. *BMC Genomics* 2021;22:357.
13. Scheinin I, Sie D, Bengtsson H, et al. DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly. *Genome Res* 2014;24:2022-32.
14. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Wenger AM, et al. Variant review with the integrative genomics viewer. *Cancer Res* 2017;77:e31-4.
15. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 2016;32:3047-8.
16. Beggs R, Yang ES. Targeting DNA repair in precision medicine. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2019;115:135-55.
17. Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer* 2016;16:35-42.
18. Heeke AL, Pishvaian MJ, Lynce F, et al. Prevalence of homologous recombination-related gene mutations across multiple cancer types. *JCO Precis Oncol* 2018;2018:PO.17.00286.
19. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, et al. Olaparib plus Bevacizumab as first-line maintenance in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2019;381:2416-28.
20. Sunada S, Nakanishi A, Miki Y. Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly(ADP-ribose)

- polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer Sci* 2018;109:893-9.
21. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207-11.
 22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
 23. Mc Sherry EA, Mc Goldrick A, Kay EW, et al. Formalin-fixed paraffin-embedded clinical tissues show spurious copy number changes in array-CGH profiles. *Clin Genet* 2007;72:441-7.
 24. Chin SF, Santonja A, Grzelak M, et al. Shallow whole genome sequencing for robust copy number profiling of formalin-fixed paraffin-embedded breast cancers. *Exp Mol Pathol* 2018;104:161-9.
 25. Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S, et al. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract* 1993;189:66-72.
 26. Hostetter G, Kim SY, Savage S, et al. Random DNA fragmentation allows detection of single-copy, single-exon alterations of copy number by oligonucleotide array CGH in clinical FFPE samples. *Nucleic Acids Res* 2010;38:e9.
 27. Van der Linden M, Raman L, Vander Trappen A, et al. detection of copy number alterations by shallow whole-genome sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2019.
 28. Chaubey A, Shenoy S, Mathur A, et al. Low-pass genome sequencing: validation and diagnostic utility from 409 clinical cases of low-pass genome sequencing for the detection of copy number variants to replace constitutional microarray. *J Mol Diagn* 2020;22:823-40.

Risultati preliminari per la definizione dell'intervallo di riferimento per l'indoxyl solfato (indicano) nelle urine

Claudio Burrini, Beatrice Morrocchi

Istituto Ricerche Cliniche Prof. M Fanfani, Firenze

ABSTRACT

Preliminary results for the definition of a reference interval for urine indoxyl sulfate (indican).

Introduction: the term "gut dysbiosis" refers to an alteration in the composition and functions of the microbiota that causes the loss of beneficial microorganisms and species diversity with the potential growth of harmful bacteria. This condition has been related to many pathologies, both intestinals and extraintestinals. One method for evaluating the dysbiosis is the determination of urinary metabolites related to intestinal fermentative processes. Among these different molecules, indoxyl-sulfate (IS) is well studied. In this paper, the IS measurement was performed in a group of subjects in order to establish a reference interval.

Methods: the measurement was carried out by HPLC method using a fluorescence detector on early morning urine void. The results were expressed for urine creatinine concentration.

Results: in a group of 68 subjects (35 males, 33 females), the mean IS concentration was 22.3 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine with a standard deviation of 6.8 and a range of 8.2-36.6. The reference interval at 95%, calculated with the "robust method", was 9.0-36.3 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine. The 90% confidence intervals, calculated with the "bootstrap method", for the lower and upper limit of the reference interval were 6.8-11.5 and 34.0-38.6 respectively.

Conclusion: this study is one of the first contributions to the definition of a reference interval for this metabolite in the first morning urine void.

Parole chiave: disbiosi, indicano, intervalli di riferimento.

INTRODUZIONE

Con il termine disbiosi si intende un'alterazione di composizione e funzioni del microbiota intestinale che si manifesta in una perdita di microrganismi benefici e/o diversità di specie con potenziale crescita di batteri dannosi (1-3). Questa condizione è stata associata a molte patologie sia intestinali (4-6) che extraintestinali: diabete, cirrosi epatica, disturbi dello spettro autistico (ASD, autistic spectrum disorder), malattie mentali, nefropatia cronica (CKD, chronic kidney disease), Parkinson (PD, Parkinson's disease), asma (7-13).

La ricerca dei metaboliti dei processi fermentativi intestinali è uno dei metodi utilizzati per la valutazione dei fenomeni di alterata crescita batterica nell'intestino.

Tra le varie sostanze presenti nella matrice urinaria il marcatore di disbiosi più utilizzato è sicuramente l'indoxyl solfato (IS, indicano). IS è una tossina uremica (14) che si forma nel fegato per idrossilazione dell'indolo ad

opera di enzimi appartenenti alla famiglia del citocromo P450 e successiva coniugazione con lo ione solfato ad opera delle sulfotransferasi. Circola legato per il 90% all'albumina sierica e l'eliminazione avviene tramite le urine grazie all'azione degli organic anion transporters 1/3 (OATs) del tubulo contorto prossimale. L'indolo ha origine intestinale e proviene dalla trasformazione del triptofano assunto con la dieta, ad opera di enzimi triptofanasi prodotti da alcune specie batteriche (come *Escherichia coli*) (15).

Presso il Laboratorio analisi dell'Istituto Ricerche Cliniche Prof. M. Fanfani (Firenze) la misura di IS nelle urine viene effettuata per la valutazione di fenomeni di alterata crescita batterica intestinale. In letteratura, sono disponibili numerosi studi su questo analita ma nessuno aveva l'obiettivo di indicarne l'intervallo di riferimento (16,17).

Scopo di questo lavoro è contribuire alla definizione di tale intervallo per lo IS come marcatore di disbiosi intestinale nella popolazione adulta.

Autore di corrispondenza: Claudio Burrini, Istituto Ricerche Cliniche Prof. M Fanfani, piazza della Indipendenza 18/b 50129 Firenze.
Tel. 05549701, E-mail: claudio.burrini@istitutofanfani.it

Ricevuto: 17.02.2022

Revisionato: 15.03.2022

Accettato: 27.04.2022

Publicato on-line: 18.05.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.032

METODI

Partecipanti

I criteri di selezione dei soggetti del gruppo di studio sono stati i seguenti:

- età compresa tra 18 e 60 anni e indice di massa corporea (BMI) compreso tra 18,5 e 29,9;
- non utilizzo di probiotici e di integratori alimentari contenenti triptofano, né dieta vegana (18);
- non assunzione farmacologica di inibitori della pompa protonica, diuretici, né terapia antibiotica negli ultimi tre mesi (19,20).

Sono stati esclusi inoltre i pazienti con patologie a carico del sistema digerente (diarrea, stipsi, meteorismo, intolleranze alimentari) o patologie caratterizzate da un aumento della produzione intestinale dei metaboliti della fermentazione batterica (CKD, ASD, PD, asma, tumori del colon retto, sclerosi multipla).

Sono stati arruolati 70 soggetti (35 maschi e 35 femmine) tra i pazienti sottoposti a check-up presso l'Istituto comprendente l'esame chimico fisico delle urine. Nella Tabella 1 sono presentate delle caratteristiche del gruppo.

Sono stati inoltre arruolati 7 soggetti affetti da patologie correlate a fenomeni disbiotici intestinali come gruppo di verifica (21-23):

- maschio (50 anni, BMI 26), con storia di intervento chirurgico per asportazione di un adenocarcinoma del colon-retto;
- femmina (50 anni, BMI 19,5), con disturbi intestinali dovuti ad intolleranze alimentari;
- maschio (55 anni, BMI 24,5), asmatico in terapia con cortisonici;
- femmina (56 anni, BMI 24,7), affetta da PD;
- femmina (24 anni, BMI 19,4), con problemi di stipsi, meteorismo ed asma allergico;
- femmina (50 anni, BMI 20,4), affetta da sclerosi multipla;
- femmina (53 anni, BMI 19,1), affetta da stipsi.

I risultati ottenuti su questo gruppo sono stati elaborati separatamente da quelli del gruppo di studio e confrontati solo graficamente con questi.

Tutti i partecipanti allo studio hanno letto e sottoscritto

Tabella 1

Caratteristiche della popolazione studiata (70 soggetti)

Caratteristica	Classe	Numero soggetti	Frequenza %
Sesso	maschi	35	50,0
	femmine	35	50,0
BMI	18,5-24,9	53	75,7
	25,0-29,9	17	24,3
Età	18-29 anni	15	21,4
	30-39 anni	14	20,0
	40-49 anni	16	22,9
	50-60 anni	25	35,7

BMI, indice di massa corporea.

sia il consenso informato, sia la documentazione relativa alla spontanea donazione dei campioni ai fini di ricerca. Lo studio è stato condotto secondo i principi espressi nella dichiarazione di Helsinki e delle successive revisioni (2013).

Tutti i soggetti sono stati arruolati sulla base della anamnesi derivata dall'intervista e le risposte fornite al questionario. Non sono stati valutati altri parametri biochimici.

Metodi analitici

La determinazione di IS nelle urine è stata effettuata in cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC). È stato utilizzato il kit diagnostico della Ditta ERRECI (Opera, MI). Il kit comprende la colonna cromatografica, la fase mobile, una soluzione diluente ed uno standard di calibrazione liofilizzato in matrice utilizzato per la taratura del sistema. Il cromatografo liquido S1125 dello stesso produttore è collegato ad un detector a fluorescenza Shimadzu RF20A.

La creatininuria è stata misurata con il metodo di Jaffé (picrato alcalino) su COBAS C501 Roche.

Procedura

La determinazione di IS è stata effettuata sul mitto intermedio delle prime urine del mattino. Se non analizzati in giornata i campioni venivano conservati a -20 °C. In queste condizioni l'analita è stabile per almeno 2 settimane. La procedura prevede la diluizione con un opportuno reagente e la successiva iniezione in colonna della soluzione ottenuta (Figura 1). Il metodo presenta un CV% analitico del 2,9 (intra-serie) e del 3,7 (tra-serie).

Su tutti i campioni di urine è stata misurata la creatinina; per evitare di esaminare campioni eccessivamente diluiti o concentrati, sono stati esaminati solo campioni con limiti definiti di creatininuria: 40-278 mg/dL per i maschi e 29-226 mg/dL per le femmine. Il CV% analitico del metodo per questa misura è di 1,3 per la ripetibilità intra-serie e di 2,5 per quella tra-serie.

Tutte le sedute analitiche sia dello IS che della creatinina sono state validate tramite l'uso di controlli di qualità in matrice (BioRad per la creatinina ed ERRECI

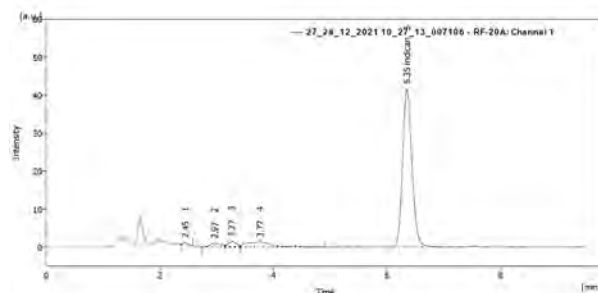


Figura 1

Cromatogramma ottenuto dalla diluizione di 10 µL di campione con 1 mL di reagente A. Iniezione 10 µL, flusso 0,6 mL/min, temperatura 30 °C, λem 280 nm, λem 390 nm, sensibilità high, gain 4.

per lo IS) su due livelli di concentrazione. I valori di riferimento e la gestione delle relative carte di controllo seguono le indicazioni del documento SIBioC del 2008 (24).

I risultati sono stati espressi correggendo il valore dell'IS espresso in $\mu\text{mol/L}$ per la creatinuria espressa in mmol/L ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina).

Analisi statistica

La ricerca degli outliers, eseguita mediante analisi grafica e confermata con il metodo dell'intervallo interquartile, il test di Levene per l'omogeneità della varianza, l'analisi di questa (analysis of variance, ANOVA) ed i test "t bilaterale" sono stati effettuati tramite il programma analisi dati di Excel. Con il software aggiuntivo "reference value advisor" ver. 2.1 del 29 febbraio 2012 è stato elaborato l'intervallo di riferimento al 95% (95% IR) con il metodo robusto e con il bootstrap percentile i relativi limiti di confidenza al 90% (90%IC) (25-26). Il test di verifica della normalità della distribuzione dei dati con il test di Shapiro Wilk ed il test grafico q-q plot sono stati effettuati con il programma "OpenStat" ver. 3 del 29 giugno 2006.

RISULTATI

I risultati di IS ottenuti nei 70 campioni analizzati erano compresi nell'intervallo tra 8,2-51,0 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina. La distribuzione dei valori presentava una media di 23,2 ed una mediana di 23,1 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina.

L'analisi grafica (Figura 2) ha evidenziato la presenza di due outliers, confermata anche con il metodo dell'intervallo interquartile. Questi erano relativi a concentrazioni di IS 50,4 e 51,0 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina misurate nelle urine di due femmine con BMI ed età rispettivamente di 24,8 e 23,4 e di 52 e 56 anni.

L'eliminazione di questi due dati ha prodotto una nuova distribuzione (68 campioni, 35 maschi e 33 femmine) con intervallo 8,2-36,6, media 22,3, mediana 22,7 ed DS di 6,8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina. Questa nuova distribuzione di valori è stata sottoposta al test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità della distribuzione ($W=0,9804$, $p=0,413$) e rappresentazione grafica con il

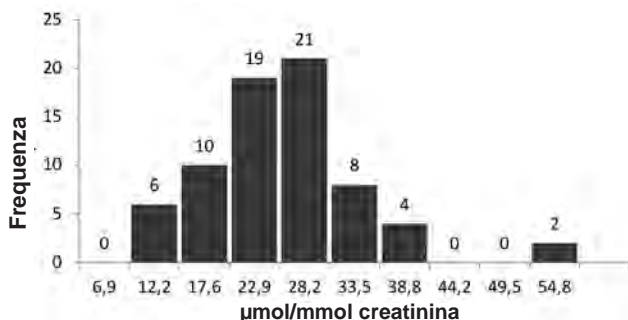


Figura 2

Distribuzione dei risultati di indicano nei 70 soggetti.

metodo quantile-quantile plot.

Nella Tabella 2 sono presentati i risultati dei 68 soggetti suddivisi per sesso, età e BMI.

I risultati ottenuti nei sottogruppi maschi/femmine e normopeso/sovrappeso sono stati confrontati con un test "t bilaterale". I risultati (rispettivamente $p=0,144$; $p=0,620$) hanno mostrato che non vi erano differenze statisticamente significative.

I dati suddivisi per classe di età sono stati sottoposti a test di Levene per la verifica dell'omogeneità della varianza ($p=0,265$) e poi a test ANOVA con risultato statisticamente non significativo ($p=0,314$). Le classi di età <30 e >50 sono comunque state sottoposte a test "t bilaterale". Anche questa verifica non ha evidenziato differenze significative ($p=0,381$).

I dati sono stati, quindi, elaborati nel loro insieme per la definizione degli intervalli di riferimento (Tabella 3).

I risultati ottenuti nel gruppo di controllo (persone affette da patologie caratterizzate da squilibri del

Tabella 2

Valori ottenuti nei 68 soggetti finali suddivisi per sesso, classe di età e BMI. Tutti i valori sono espressi come $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina

classe	N	media	mediana	DS	intervallo
maschi	35	21,3	21,3	6,6	8,5 - 36,6
femmine	33	23,7	23,7	6,5	8,2 - 36,0
18-29 anni	15	21,1	22,0	6,8	8,6 - 33,5
30-39 anni	14	20,5	21,5	7,7	8,2 - 31,2
40-49 anni	16	24,5	23,0	7,4	13,3 - 36,6
50-60 anni	23	22,8	24,0	5,2	9,0 - 30,0
BMI 18,5-24,9	17	23,2	23,9	7,4	8,6 - 34,4
BMI 25,0-29,9	51	22,2	22,6	7,1	8,2 - 36,6

BMI, indice di massa corporea

Tabella 3

Riepilogo dei valori di riferimento ed i loro limiti di confidenza. I limiti inferiore e superiore di riferimento al 95% sono stati calcolati con il "metodo robusto". I rispettivi intervalli di confidenza (IC) al 90% sono calcolati con il metodo "bootstrap percentile" (25,26)

N campioni	limite inferiore	90% IC	limite superiore	90% IC
68	9,0	6,8 - 11,5	36,3	34,0 - 38,6

microbiota intestinale) sono stati confrontati graficamente con il limite superiore dell'intervallo di riferimento ed il suo limite di confidenza. Il risultato è illustrato nella Figura 3.

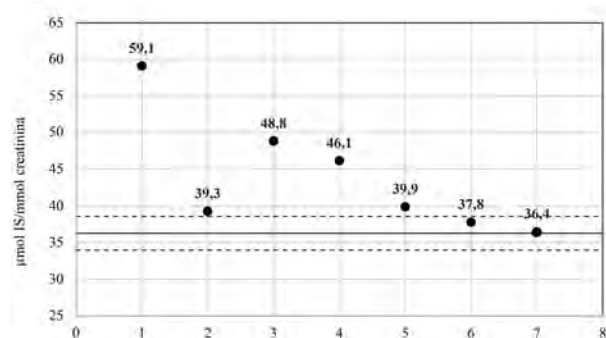
DISCUSSIONE

La popolazione oggetto dello studio è stata attentamente selezionata eliminando molti dei fattori confondenti conosciuti. Sono stati esclusi infatti tutti i soggetti che presentavano patologie caratterizzate da un aumento dell'escrezione urinaria dello IS, e i pazienti in trattamento con inibitori della pompa protonica, in quanto a rischio di sovracrescita batterica a livello dell'intestino tenue [small intestine bacterial overgrowth (SIBO)] ed in generale tutti i soggetti in terapia cronica farmacologica (27).

L'IS è un metabolita epatico dell'indolo che a sua volta viene prodotto a partire dal triptofano nell'intestino ad opera delle triptofanasi di alcune specie batteriche. L'uso di integratori a base di questo amminoacido è stato quindi un ulteriore motivo di esclusione. L'altra fonte importante di triptofano è l'alimentazione; la dieta priva di proteine animali determina un abbassamento dei livelli di IS nelle urine rispetto alla dieta onnivora e perciò anche i soggetti con dieta vegana sono stati esclusi. I reclutati, tutti soggetti senza restrizioni alimentari, non sono stati ulteriormente classificati in base alla composizione della dieta.

Jumpertz R, et al. (28) hanno dimostrato che, attraverso un sistema di selezione e proliferazione microbica legato all'abbondanza di cibo assunto, il microbiota intestinale possa aumentare l'energia estratta dagli alimenti ingeriti con la dieta e quindi svolgere un ruolo attivo nei fenomeni di elevato aumento ponderale (29). Pertanto nella selezione dei criteri di inclusione sono stati posti i limiti di 18,5 e 29,9 di BMI in modo da eliminare i soggetti sottopeso (BMI <18,5) e quelli obesi (BMI >29,9).

Figura 3



Collocazione rispetto al limite superiore dell'intervallo di riferimento (linea continua) e all'intervallo di confidenza (linee tratteggiate) delle concentrazioni urinarie di indicano (µmol/mmol creatinina) misurati nel gruppo di verifica: 1) uomo, intervento chirurgico per asportazione adenocarcinoma colon-retto; 2) donna, intolleranze alimentari; 3) uomo, asma, 4) donna, malattia di Parkinson. 5) donna, stipsi, meteorismo e asma allergico, 6) donna, sclerosi multipla. 7) donna, stipsi.

Teruya T, et al. (30) hanno segnalato una differenza significativa tra i livelli urinari di IS dei soggetti di più giovane età (24-36 anni) ed anziani (69-81 anni); di conseguenza, tra i criteri di selezione è stato inserito il limite di 60 anni.

I dati raccolti sono stati confrontati con uno studio di metabolomica del 2013 (31), in cui era stato valutato un ampio pannello di sostanze, tra cui l'IS, nella prima urina del mattino. La ricerca è stata condotta su 22 soggetti (14 maschi, 8 femmine di età compresa tra 18 e 67 anni) definite genericamente sane. Gli autori hanno riportato per tutti gli analiti solo i risultati della mediana e l'intervallo di dispersione. Per l'IS le concentrazioni misurate erano comprese in un intervallo di 6,0-64,8 con una mediana di 22,4 µmol/mmol creatinina. I risultati da noi ottenuti (compresi gli outliers) presentano una mediana comparabile (23,1) ma un intervallo più ristretto (8,2-51,0).

L'esistenza di una relazione tra peso, sesso, età e le concentrazioni di IS urinario è stata statisticamente valutata. I valori ottenuti di p hanno indicato che tra le distribuzioni delle varie classi di dati non vi erano differenze statisticamente significative.

Il limite inferiore dell'intervallo di riferimento è stato confrontato con lo studio di Weber D, et al. (32). In questo studio l'IS era stato misurato nelle prime urine del mattino di soggetti sottoposti a terapia antibiotica dopo trapianto di cellule staminali allogeniche. I pazienti che presentavano, nei primi 10 giorni dopo l'operazione, una concentrazione di IS <6,9 µmol/mmol creatinina avevano una più alta probabilità di decesso correlato al trapianto ad un anno dall'intervento rispetto ai pazienti con una concentrazione di IS superiore a questo valore. Gli autori hanno correlato questo risultato alla compromissione quali- e quantitativa della flora batterica intestinale.

Un altro gruppo di ricerca in un lavoro successivo del 2021 (33) ha misurato l'IS urinario in soggetti al momento dell'ammissione e dopo 72 ore dal ricovero in terapia intensiva. Utilizzando il valore decisionale di 6,9 µmol/mmol creatinina è stato osservato che i pazienti che presentavano un valore inferiore erano soggetti a degenze più lunghe ed avevano una più alta probabilità di decesso durante l'anno di monitoraggio rispetto ai pazienti con valori di IS maggiori del valore decisionale.

La concentrazione più bassa misurata sui campioni analizzati nel presente studio è stata di 8,2 µmol/mmol creatinina e l'intervallo di riferimento elaborato dai dati ottenuti ha un limite inferiore di 9,0 µmol/mmol creatinina con un intervallo di confidenza 6,8-11,5 µmol/mmol creatinina.

Per la verifica del limite superiore dell'intervallo di riferimento è stato costruito un modello grafico di confronto tra questo valore ed i risultati della misura dell'IS nelle urine del gruppo di controllo

Le concentrazioni misurate nel gruppo di verifica, si collocano tutte e sette oltre il limite superiore di riferimento: due di esse dentro l'intervallo di confidenza, le altre cinque oltre l'intervallo (Figura 3).

Il modello qui presentato è ovviamente limitato dalla bassa numerosità dei soggetti utilizzati ma comunque è in grado di fornire un punto di verifica dei dati elaborati.

CONCLUSIONI

I fenomeni disbiotici sono in generale una condizione molto complessa da valutare; infatti l'attività e la numerosità delle specie presenti nell'intestino sono influenzate da molti fattori (come lo stile di vita, la dieta, i farmaci assunti). Un metodo molto diffuso per la valutazione della alterata crescita microbica nell'intestino è la ricerca nelle urine dei prodotti della fermentazione batterica (34). L'IS è probabilmente il più utilizzato tra questi. Il presente lavoro rappresenta uno dei primi contributi alla definizione di un intervallo di riferimento calcolato nelle prime urine del mattino per questo metabolita, pur con i limiti di una numerosità campionaria non particolarmente rilevante.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontiers. *Gut* 2016;65:330-9.
- Tiffany CR, Baumlér AJ. Dysbiosis: from fiction to function. *Am j Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019;317:G602-8.
- Veneruso I, Tomaiuolo R, Cariati F, et al. Il microbiota umano: il buono, il brutto ed il cattivo. *Biochim Clin* 2021;45:109-21.
- Nishida A, Inoue R, Inatomi O, et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 2018;11:1-10.
- Binfrate L, Tack J, Grattagliano I, et al. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: current knowledge, perspectives and therapeutic options. *Scan J of Gastroenter* 2013;48:995-1009.
- Li Y, Xia S, Jiang X, et al. Gut microbiota and diarrhea: an updated review. *Front Cell Infect Microbiol* 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.625210.
- Pircalabioru GG, Corcionivoschi N, Gundogdu O, et al. Dysbiosis in the development of type I diabetes and associated complications: from mechanism to targeted gut microbes manipulation therapies. *Int j Mol Sci* 2021. doi: 10.3390/ijms22052763.
- Tilg H, Grander C, Moschen AR, et al. How does the microbiota affect liver disease. *Clin Liver Dis* 2016;8:123-6.
- Dieme B, Mavel S, Blaco H, et al. Metabolomic study of urine in autism spectrum disorder using a multiplatform analytical methodology. *J Proteome Res* 2015;14:5273-82.
- Roger GB, Keating DJ, Young RL, et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanism and pathways. *Mol Psychiatry* 2016;21:738-48.
- Jazani NH. Impact of gut dysbiosis on neurohormonal pathways in chronic kidney disease. *Diseases* 2019;7:21.
- Huang Y, Liao J, Liu X, et al. Review: the role of intestinal dysbiosis in Parkinson's disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:615075.
- Hufnagl K, Pali-Scholl I, Roth-Walter F, et al. Dysbiosis of the gut and lung microbiota has a role in asthma. *Semin Immunopathol* 2020;42:75-93.
- Niwa T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J Sci Med* 2010; 72:1-11.
- Roager HM, Licht RT. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun* 2018;9:3294.
- Farowski F, Els G, Tsakmaklis A, et al. Assessment of urinary 3-indoxyl sulfate as marker for gut microbiota diversity and abundance of Clostridiales. *Gut Microbes* 2019;10:133-41.
- Olesova D, Galba J, Piestansky J, et al. A novel UHPLC-MS method targeting urinary metabolomic markers for autism spectrum disorder. *Metabolites* 2020;10:443.
- Patel PK, Luo FJG, Plummer NS, et al. The production of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in vegetarians versus omnivores. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:982-8.
- Lombardo L. La SIBO: novità diagnostico terapeutiche. *Rivista Società Italiana Medicina Generale* 2013;1:27-30.
- Ramirez J, Guarner F, Fernandez LB, et al. Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;10:572912.
- Zou S, Fang L, Lee MH. Dysbiosis of microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterol Rep* 2018;6:1-12.
- Caminero A, Maisel M, Jabri B, et al. Mechanism by which gut microorganisms influence food sensitivities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:7-18.
- Noto D, Miyake S. Gut microbiota and multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2022;235:108380.
- Ottomano C, Ceriotti F, Galeazzi M, et al. Linee guida per la gestione dei programmi di controllo di qualità interno. *Biochim Clin* 2008;32:102-21.
- Ceriotti F. Gli intervalli di riferimento nel nuovo millennio. *Biochim Clin* 2007;31:254-66.
- CLSI. Defining, establishing, and verifying reference interval in the clinical laboratory; approved guidelines-third edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2008.
- Jackson MA, Verdi S, Maxan ME, et al. Gut microbiota association with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun* 2018;9:2655.
- Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ. Energy-balance studies reveal association between gut microbes, caloric load, and nutrition absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:58-65.
- Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, et al. Microbial dysbiosis induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *Br j Nutr* 2020;123:1127-37.

30. Teruya T, Goga H, Yanagida M, et al. Aging markers in human urine: a comprehensive, non targeted LC/MS study. *FASEB Bioadv* 2020;12:720-33.
31. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLOS ONE* 2013;8:e73076.
32. Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, et al. Low urinary indoxyl sulfate level early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood* 2015;126:1723-8.
33. Kuo SZ, Dettmer K, Annavajhala MK, et al. Association between urinary 3-indoxyl sulfate, a gut microbiome-derived biomarker, and patient outcomes after intensive care unit admission. *J Critic Care* 2021;63:15-21.
34. Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, et al. Toward microbial fermentation metabolites as markers for health benefit of probiotics. *Nutr Res Rev* 2015;28:42-66.

The consumption of alcohol and cocaine among drunk-drivers: retrospective data analysis of a protocol for driving license regranting program

Paolo Franceschini, Gianfranco Petriccioni, Isa Mavi Sbarbaro, Ilaria Baudone, Cinzia Corsini, Paolo Bucchioni
SSD Tossicologia, Laboratorio analisi, Ospedale San Bartolomeo, ASL5, Sarzana (SP)

ABSTRACT

Introduction: alcohol and cocaine are frequently used together; this co-abuse compromises the physical and mental requirements included in the assessment of fitness to drive. The assessment for the issuing of the certificate of fitness to drive is released by Local Medical Commissions after clinical examination and toxicological analysis. The aim of this paper is to estimate the prevalence of cocaine use among drunk-drivers during a specific driving regranting protocol, in order to assess the usefulness of the inclusion of cocaine metabolites in hair analysis in this category of subjects.

Methods: according to the toxicological protocol at the Regional Reference toxicological laboratory of the "Liguria Levante" in Sarzana (La Spezia) at San Bartolomeo Hospital, in addition to the quantification of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum by HPLC and Ethylglucuronide (ETG) in keratin matrix, also cocaine and its metabolites, especially Coca-ethylene (CE) has been tested in hair by LC-MS/MS. The protocol has been applied on biological samples collected from 2215 drunk-drivers.

Results: the 6.6% of the 2215 hair samples analyzed were classified as non-moderate alcohol users (ETG >30 pg/mg). Among these 0.1% were cocaine users and 0.9% consumed together alcohol and cocaine, as highlighted by the presence of CE. Out of the 94.4% of the 2215 hair samples with ETG <30 pg/mg, 3.9% and 6.1% were positive for cocaine, and CE respectively.

Conclusion: This study demonstrates the importance of toxicological analysis of drugs of abuse in hair and the need to include the analysis in specific protocols for driving regranting, such as the one here adopted.

Keywords: alcohol, cocaine and metabolites, hair analysis

INTRODUCTION

Alcohol and cocaine are frequently used together (1). The use of both cocaine and alcohol has been reported in clinical samples from substance abusers in the US (2-4), in the UK (5), as well in other countries (6). Use of alcohol and cocaine has been reported in the general population (7) and among specific subjects such as those attending dance music events (8). Animal studies have also found a relationship between the self-administration of alcohol and cocaine (9).

The combination of alcohol and cocaine is popular among drug users, perhaps because of more intense feelings of "high" beyond that perceived with either drug alone, less intense feelings of alcohol-induced inebriation

and tempering of discomfort when coming down from a cocaine "high".

Cocaine consistently antagonizes the learning deficits, psychomotor performance deficits and driving deficits induced by alcohol. The combination of alcohol and cocaine tends to have greater-than-additive effects on heart rate, concomitant with up to 30% increased blood cocaine levels. Both prospective and retrospective data further reveal that co-use leads to the formation of cocaethylene (CE), which may potentiate the cardiotoxic effects of cocaine or alcohol alone. More importantly, retrospective data suggest that the combination can potentiate the tendency towards violent thoughts and threats, which may lead to an increase of violent behaviors (10).

Corresponding Author: Paolo Bucchioni SSD Tossicologia Ospedale San Bartolomeo, Via Cisa Loc. Santa Caterina Sarzana 19038 (SP). E-mail: paolo.bucchioni@asl5.liguria.it

Received: 27.04.2022

Revised: 03.05.2022

Accepted: 08.06.2022

Published online: 23.06.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.042

The Italian Traffic Code includes a specific article (article 119) to establish the “*Physical and psychic requirements for the driving license*” (11). The assessment for the issuing of the certificate of fitness to drive is released by Local Medical Commissions after clinical examination and toxicological analysis.

In most European countries, the procedures for driving license re-issuing to drivers convicted for driving under the influence of alcohol (drunk-drivers) are generally based on the assessment of alcohol use, utilising the determination of indirect biomarkers such as carbohydrate-deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyltransferase (GGT), aspartate/alanine aminotransferase (AST/ALT), mean corpuscular volume (MCV) and/or direct biomarkers (ethanol metabolites) in blood, urine and/or hair samples (12-15). The presence of an underlying simultaneous use of illicit drugs in drunk-drivers is thus not always investigated (16,17).

The aim of this study is to estimate the prevalence of drug use in a northwest Italian population of drunk-drivers, performed during the driving license regranting process, in order to verify the usefulness of the inclusion of toxicology tests on hair samples in the regranting protocol of drunk-drivers.

METHODS

The retrospective study was conducted on 2 215 drunk-drivers examined by the Local Medical Commission of North-West Tuscany from 2017-2019 using a protocol that included the quantification of Ethyl-glucuronide (ETG) and Cocaine and its metabolites (CE) on keratin matrix and CDT on serum samples.

The analysis were performed at the Regional Reference Toxicological Laboratory of the “LiguriaLevante” located in Sarzana (La Spezia) at San Bartolomeo Hospital.

The quantification of ETG and Cocaine on keratin matrix was performed by liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (Agilent infinity 1260 QQQ 6470 LC/MS-MS) while CDT was evaluated by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC Thermofisher Ultimate 3000).

Keratin matrix sampling was obtained on 3-6 cm hair segments taken from the neck area; alternatively the chest hair or limbs were sampled according to the indications of the Society of Hair Testing Consensus (SOHT, 2019) (18,19).

For the reporting of the obtained values, the cut-offs suggested by the guidelines of the Italian Istituto Superiore di Sanità (ISS) (20,21), forensic toxicologists (22,23) and SOHT were adopted.

RESULTS

A total of 2 215 samples of drunk-drivers were examined; Table 1 summarizes the number of examined samples according to the results obtained for tested analytes.

4.6% show excessive alcohol consumption (ETG >30 pg/mg) and among these 1% are also cocaine

users. 84.3% of the samples show an ETG value <30 pg/mg (moderate consumption of alcohol or abstem), but, 10% of these subjects are cocaine consumers (Figure 1). In particular, among cocaine users (total 11.0%), the presence of the active metabolite cocaethylene (CE), an indicator of concomitant alcohol consumption, is found in 7% of samples (Figure 2).

Furthermore, the data of cocaine users among drunk-drivers is confirmed over the years, around 10% (Figure 3).

DISCUSSION

Overconsumption of alcohol and impaired driving represent a major public health issue worldwide, and alcohol is the most prevalent psychoactive substance found in the driving population, with a great variation between different countries (highest prevalence in the southern and western countries of Europe) (24-26). In 1995, the International Council on Alcohol, Drugs & Traffic Safety proposed a protocol for the regranting of driving license in drunk-drivers, providing an accurate methodology based on medical examination and alcohol-specific biomarkers determination for the detection of alcohol abuse. Up to now, the regranting procedure has not been revised at international level, and the phenomenon of polydrug use is not diffusely included in the protocols of driving license regranting process on drunk-drivers. Presently, in the majority of the European countries, after the period of the driving license retrieval, drunk-drivers undergo alcohol use investigation, while the toxicological analysis on hair and urine is systematically performed only on subjects convicted for driving under the influence of drugs.

It is well known that hair analysis, providing information on long-term use of illicit drugs, allows the identification of drug use on a greater number of subjects than urine analysis does and may thus represent a better tool to check for drug abstinence as required by the law (27,28).

Compared to other matrixes and keratinized materials, the most important advantage of hair analysis is the possibility for retrospective monitoring of an accurate specific time period (29), which could be well defined through the hair growth rate/cycle (in forensic investigations an average value of 1 cm/month is

Table 1
Number of positive and negative samples

N	ETG+	ETG-	ETG+	ETG-	ETG+	ETG-	
	COCA-	COCA-	COCA + CE-	COCA+ CE-	COCA+ CE+	COCA+ CE+	
2017	674	27	571	1	16	8	51
2018	748	37	622	1	33	8	47
2019	793	38	675	1	38	3	38
Total	2215	102	1868	3	87	19	136
%		4.6	84.3	0.1	3.9	0.8	6.1

ETG+, positive to Ethyl-glucuronide (>30 pg/mg); COCA-, negative to Cocaine; ETG-, negative to Ethyl-glucuronide (<30 pg/mg); COCA+, positive to Cocaine; CE+, positive to Cocaethylene; CE-, negative to Cocaethylene.

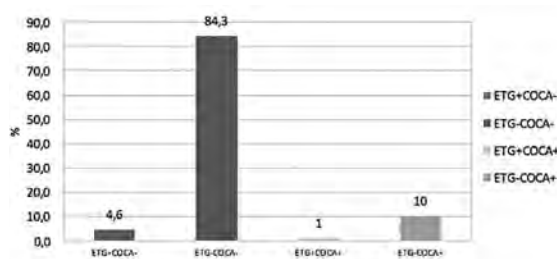


Figure 1
Percentages of positive and negative samples to alcohol and cocaine

ETG+, positive to Ethyl-glucuronide (>30 pg/mg); ETG-, negative to Ethyl-glucuronide (<30 pg/mg); COCA+, positive to cocaine; COCA-, negative to cocaine.

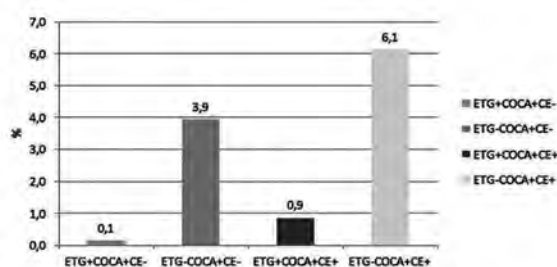


Figure 2
Percentages of positive and negative samples to Cocaethylene

ETG+, Ethyl-glucuronide >30 pg/mg; ETG-, Ethyl-glucuronide <30 pg/mg; COCA+, positive to cocaine; COCA-, negative to cocaine; CE+, positive to cocaethylene; CE-, negative to cocaethylene.

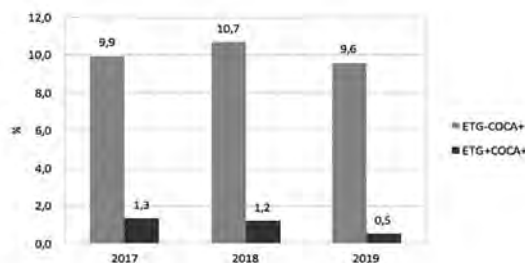


Figure 3
Summary of the cocaine positive samples during the years

ETG+, Ethyl-glucuronide >30 pg/mg; ETG-, Ethyl-glucuronide <30 pg/mg; COCA+, positive to cocaine; COCA-, negative to cocaine.

commonly applied). Therefore, a time-selecting filter can be set with the investigation of a hair specimen of a certain length, which defines the monitoring time frame, according to the purpose of forensic investigation.

Hair analysis is widely accepted and applied in different fields (i.e drug fatalities, workplace drug testing, drug-facilitated crimes). The main goal of these applications is the long-term monitoring of misuse of drugs, pharmaceuticals and alcohol or the documentation of the subject's abstinence (30).

A particular picture emerged from our study, illustrating how in the population of subjects monitored by the Legal Medical Commissions from year 2017 to 2019 for driving under the influence of alcohol, as many as 11% are also cocaine users.

Moreover, the highest percentage of cocaine users can be found into the moderate drinker category with an ETG value <30 pg/mg; this result is rather important for the driving license granting program.

The data obtained confirm that the toxicological screening in drunk subjects is mandatory in this category of subjects.

CONCLUSION

The present study proves that the increasing phenomenon of drug use should be taken into consideration in the population of drunk-drivers license regranting program.

Concurrent abuse of alcohol and cocaine represents a dangerous psycho-behavioral pattern, with a high frequency in the studied population. The absence of a toxicological analysis in hair could compromise the preventive efficacy of the regranting system itself.

The results of hair testing in large population groups could indicate that exposure to drugs or xenobiotics should be investigated in epidemiological studies (31) and reveal new trends in drug markets. Therefore, the objective of applying these forensic or clinical tests could be profitably used, as predicted by Baumgartner MR (30), to determine a positive impact in the behavior of drivers.

In the future, in order to identify the underlying patterns of substance use in drunk-drivers, assessment procedures could and should be improved, with the aim to maximize specificity and efficacy of prevention and treatment approaches.

A commission has been recently set up at the Italian Ministry of Health in collaboration with the main scientific societies in field. In December 2021 the document "Guidelines for the assessment of the eligibility to drive in subjects with the use/abuse of alcoholic beverages", has been issued (32); it provides on the matter that could be used presently by national institutions and translated into legal regulations in the future.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Cateano R, Weisner C. The association between DSM-III-R alcohol dependence, psychological distress and drug use. *Addiction* 1995;90:351-9.
2. Craddock S, Rounds-Bryant J, Flynn P, et al. Characteristics and pretreatment behaviors of clients entering drug abuse treatment: 1969 to 1993. *Am J Drug Alcohol Abuse* 1997;23:43-59.
3. Brooner RK, King VL, Kidorf M, et al. Psychiatric and substance use comorbidity among treatment-seeking opioid abusers. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:71-80.
4. Chutuape MA, Silverman K, Stitzer ML. Use of methadone take-home contingencies with persistent opiate and cocaine abusers. *J Subst Abuse Treat* 1999;16:23-30.
5. Gossop M, Marsden J, Stewart D, et al. Substance use, health and social problems of clients at 54 drug treatment agencies: intake data from the National Treatment Outcome Research Study (NTORS). *Br J Psychiatry* 1998;173:166-71.
6. M, Ferri. Primary prevention for alcohol misuse in young people: a Cochrane Systematic Review. *Ann Ist Super Sanita* 2004;40:47-53.
7. Grant BF, Harford TC. Concurrent and simultaneous use of alcohol with cocaine: Results of national survey. *Drug Alcohol Depend* 1990;25:97-104.
8. Sumnall HR, Wagstaff GF, Cole JC. Self-reported psychopathology in polydrug users. *Journal of Psychopharmacology* 2004;18:75-82.
9. Mierzejewski P, Rogowski A, Stefanski R, et al. Ethanol-reinforced behaviour predicts acquisition but not extinction of cocaine self-administration in the rat. *Alcohol Alcohol* 2003;38:543-9.
10. Pennings JM, Leccese AP, Wolff FA. Effect of concurrent use of alcohol and cocaine. *Addiction* 2002;97:773-83.
11. Requisiti fisici e psichici per il conseguimento della patente di guida. *Nuovo Codice della Strada*. D.L. 30 aprile 1992, n.285. *Gazzetta Ufficiale* n.114 del 18-5-1992 - Suppl. Ordinario n. 74. Titolo IV: Guida dei veicoli e conduzione degli animali. https://www.gazzettaufficiale.it/dettaglio/codici/strada/104_0_1 (Last access: May 2022).
12. Bortolotti F, Tagliaro F, Cittadini F, et al. Determination of CDT, a marker of chronic alcohol abuse, for driving license issuing: immunoassay versus capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int* 2002;128:53-8.
13. Appenzeller MRB, Schneider S, Yegles M, et al. Drugs and chronic alcohol abuse in drivers. *Forensic Sci Int* 2005;155:83-90.
14. Kronstrand R, Brinkhagen L, Nystrom FH. Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months. *Forensic Sci* 2012;215:51-5.
15. Maenhout TM, Baten G, De Buyzere ML, et al. Carbohydrate deficient transferrin in a driver's license regranting program. *Alcohol Alcohol* 2012;47:253-60.
16. Nickel WR. Medical screening and medical-psychological assessment as prerequisites for re-granting of licenses: summary of recommendations. *Alcohol Alcohol* 1996;31:605-7.
17. Jones AW, Holmgren A. What non-alcohol drugs are used by drinking drivers in Sweden? Toxicological results from ten years of forensic blood samples. *J Safety Res* 2012;43:151-6.
18. SoHT. Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. 2019. https://www.soht.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf (Last access: May 2022).
19. SoHT. Consensus on drugs of abuse (DOA) testing in hair. 2021. https://www.soht.org/images/pdf/Consensus_DoA_2021.pdf (Last access: May 2022).
20. Pichini S, Pacifici R. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. 2013. https://www.iss.it/droga/-/asser_publisher/CjKTPUEurcwM/content/-linee-guida-per-la-determinazione-delle-sostanze-dabuso-nella-matrice-pilifera (Last access: May 2022).
21. Pichini S, Bucchioni P, Pellegrini M, et al. Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue. <https://www.iss.it/documents/20126/0/PROCEDURE-OPERATIVE%20sangue.pdf/7d0a5216-ded9-7e23-6609-1deed0df14e1?t=1576346208583> (Last access: May 2022).
22. GTFI 2017 (Gruppo Tossicologi Forensi Italiani). Linee guida per le strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi su campioni biologici prelevati da vivente. Revisione n. 5 del 29 maggio 2017 a cura della Commissione Qualità dell'Associazione Scientifica "Gruppo Tossicologi Forensi Italiani" (GTFI) https://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2017/06/LG_biologico_revisione_2017_29_05.pdf (Last access: May 2022).
23. Favretto D, Pichini S, Bucchioni P, et al. Consensus document of the Study Group on Clinical Pharmacotoxicology and Doping of Italian Society of Clinical Biochemistry and Italian Forensic Toxicologists Group (GTFI) – for laboratories involved in the determination of substances of abuse. *Biochim Clin* 2019;43:449-52.
24. Bernhoft IM, Hels T, Lyckegaard A, et al. Prevalence and Risk of Injury in Europe by Driving with Alcohol, Illicit Drugs and Medicines. *Procedia Social and Behavioral Sciences* 2012;48:2907-16.
25. Leporati M, Salvo RA, Pirro V, et al. Driving under the influence of alcohol. A 5-year overview in Piedmont, Italy. *J Forensic Legal Med* 2015;34:104-8.
26. Jamt REG, Gjerde H, Normann PT, et al. Roadside survey on alcohol and drug use among drivers in the Arctic county of Finnmark (Norway). *Traffic Inj Prev* 2017;18:681-7.
27. Kronstrand R, Nystrom I, Forsman M, et al. Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. *Forensic Sci Int* 2010;196:55-8.
28. Tassoni G, Mirtella D, Zampi M, et al. Hair analysis in order to evaluate drug abuse in driver's license regranting procedures. *Forensic Sci Int* 2014;244:16-9.
29. Wille SMR, Baumgartner MR, Di Fazio V, et al. Trends in drug testing in oral fluid and hair as alternative matrices. *Bioanalysis* 2014;6:2193-209.
30. Baumgartner, MR. Single hair analysis. monitoring concept for P4 implementation. In: Ferrara, SD, ed. *P5 Medicine and Justice*. Berlin: Springer, 2017;500-11.
31. Rust KY, Baumgartner MR, Dally AM, et al. Prevalence of new psychoactive substances: a retrospective study in hair. *Drug Test Anal* 2012;4:402-8.
32. COMLAS. Documento linee di indirizzo sulla valutazione dell'idoneità alla guida in soggetti con uso/abuso di bevande alcoliche. 3 December 2021. <https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato3816299.pdf> (Last access: May 2022).

Economical, legal and ethical considerations on reevaluation and retesting in molecular diagnostics



Lucio Pastore^{1,3}, Barbara Lombardo^{1,3}, Maria Vitale^{1,3}, Lorella Tripodi^{1,3}, Felice Amato^{1,3}, Mario Cosenza², Gianluca Giannini²

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Napoli, Italia

²Dipartimento degli Studi Umanistici, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia

³CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

ABSTRACT

In the *-omics* era, analysis of genome and transcriptome have become extremely relevant for the elucidation of the genetic cause of a number of diseases, previously undiagnosed. In addition, microbiome analysis is becoming relevant in many pathological conditions. Identification of genetic variants is very efficient with techniques such as comparative genome hybridization (CGH)-array and with whole genome sequence (WGS) or whole exome sequence (WES) performed with next-generation sequence (NGS) methodologies. Most importantly, correct classification of variants and elucidation of their clinical significance are tasks of extreme relevance for the correct diagnosis and, often, also to indicate the most efficient therapeutic choices. However, over the years our understanding of significance of genetic variants has dramatically improved, therefore many cases would require reevaluation and, on occasions, retesting. In this article, we reviewed the major advances in the genomic diagnostics field focusing, in particular, at addressing the relevance of periodic reevaluation of results and retesting patients when significantly novel technologies are developed, focusing also on economical, legal and ethical points.

Key words: *ethics, molecular diagnostic, retesting*

THE -OMICS ERA

Analysis of genome and transcriptome

The history of genome analysis begins in 1975 when Sanger introduced the concept of DNA sequencing that became extremely popular and allowed, ultimately, the completion of human genome first draft. Today, as well as during the second half of 20th century, DNA sequence analysis has a main role in the knowledge of genome structure, function and evolution. In time, new techniques allowed the collection of an increasing range of high-quality DNA sequence information and brought down the cost for generating genome-scale data. The introduction of these new methodologies, collectively defined as next-generation sequencing (NGS), have

changed human and animal genome research allowing genotyping, identification of genome wide structural variations, *de novo* assembling and re-assembling of genome, detection of variants in mendelian and polygenic human diseases, mainly, introducing individual genome sequencing in the clinical practice (1).

NGS also allows sequencing of cellular RNAs, even at single cell level, introducing “transcriptomic analysis” (i.e., sequencing of all RNA transcripts, coding and non-coding, in an individual, a population of cells or a single cell). Several pathological conditions drive extensive change in transcriptome (2); therefore, changes in abundance of the transcripts can be used as diagnostic or prognostic markers and can provide information relevant for possible therapeutic choices.

In this opinion paper, we summarize some of the novel

Corresponding author: Lucio Pastore, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia. Email: lucio.pastore@unina.it

Received: 04.04.2022

Revised: 19.04.2022

Accepted: 17.05.2022

Published on-line: 13.06.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.038

improvement in genomic analysis methodologies and evaluate the significance of periodic case reevaluation and, eventually retesting with some economical, legal and ethical perspective.

Analysis of the “other genome”: the microbiome

The community of commensal, symbiotic and pathogen microorganisms, including bacteria, archaea, viruses, and yeast, living in a specific environment is the perfect definition of a microbiota. On the other hand, a microbiome is the entire collection of all the genomic elements of a specific microbiota. Metagenomics is the field of molecular research that studies the complexity of microbiomes. Gut microbiome, which hosts over 1000 bacterial species that encode about 5 million genes, performs many of the functions required for host physiology and survival. Human gut microbiome is not a static system and changes with host development. The dynamic and complexity nature of this system allows variations in the density and composition of bacteria the gut microbiome along longitudinal and transverse gradients (3). Human gut microbiota is composed primarily of Firmicutes and Bacteroidetes that represent 90% of gut microbiota (4). Gut microbiota has many functions and is responsible for metabolizing nutrients into bioactive food components: bacteria metabolize indigestible carbohydrates like cellulose, hemicelluloses, oligosaccharides, pectin and lignin into short chain fatty acids (SCFAs) such as butyric, propionic and acetic. These fatty acids escape from digestion in the upper gastrointestinal tract and enter the colon (5). Alterations of microbiota can result in dysfunction of the biosynthesis of SCFAs, associated to a number of pathological conditions (6). Gut microbiota exerts several other functions in human body such as modulating the immune system (7), affecting the neurological functions of the host through brain-gut communication (8). In addition, there is growing awareness that the microbiome influences tumor progression, in part through inflammatory and immune circuits (9,10).

A wide diversity of microbiome-suitable molecular analyses can be performed on biological samples, each with strengths and weaknesses. The correct type of analyses for an experiment is dependent on the scientific or diagnostic question. Amplicon analysis is the most popular characterization of gut microbiome: it consists in the amplification of 16S rRNA for bacteria and archaea and the internal transcribed spacer for fungi, highly conserved regions. Bacterial 16S rRNA genes contain 9 hypervariable regions (V1–V9) that show sequence diversity and therefore often are used as a barcode-like method to differentiate many bacterial *taxa*, sometimes at species level. Sequences are then placed into a phylogenetic tree or matched to a database (11) obtaining information relevant for a number of pathological conditions. Analysis of gut microbiome has already a recognized clinical significance in diseases such as Inflammatory Bowel Disease (IBD), (12) and is getting a relevant role as biomarker prior to cancer immunotherapy (13,14).

Genomic analyses and identification and evaluation of variants

In the past two decades, the development of comparative genomic hybridization (CGH)-array has allowed the identification of structural variants at genomic level. Among these, copy-number variants (CNVs) are genetic variations larger than 50 bp in size (usually several kb in length) that involve gain or loss of DNA segments that can include an entire gene or part of it; most often CNVs include larger genomic region encompassing multiple genes (15). CNVs have been associated with the development of several genetic diseases, including autism spectrum disorders, neurodevelopmental disorders, multiple congenital anomalies and autoimmune diseases (16). At present, genome-wide assessment of CNVs is recommended as a first level test in patients with intellectual disability, developmental delay, autism spectrum disorder, and congenital anomalies.

While many recurrent CNVs (such as those flanked by segmental duplications) have been well characterized, most CNVs are unique, requiring further investigation to determine their clinical significance. Accurate interpretation of the clinical significance of CNVs requires consistent methods for the evaluation of gene content and correlation of the patient clinical findings with those observed in patients with similar variants, with the ultimate goal of producing consistent, evidence-based clinical classification across laboratories (17). Inconsistency among laboratories can create confusion for clinicians and their patients, leaving them unable to confidently use genetic information to manage health-care decisions (18). In order to reduce discordance between CNVs classifications, a good contribution is provided by the new guidelines which take into account the clinical characteristics of a wide range of CNVs and allow a complete analysis and an accurate classification of the variants (19). However, implementation of these guidelines on a large scale is challenging, as each CNV requires considerable time to obtain a definitive classification (20).

Each CNV is classified, according to the American College of Medical Genetics (ACMG) (19), into one of the following categories: benign, likely benign, variant of uncertain significance (VOUS), likely pathogenic, or pathogenic. Benign CNVs are found with a frequency >1% in the population. These CNVs should be reported in at least 3 individuals (preferably in different datasets). Likely benign CNVs in large case-control studies show no significant disease association. VOUS are CNVs for which there is not yet sufficient knowledge to understand if they are benign or potentially associated with diseases because of conflicting or insufficient evidence. Likely pathogenic CNVs are reported in one or few cases with similar or partially overlapping phenotypes in affected individuals in which the causative gene has not yet been identified or reported and include genes whose functions can likely cause the observed clinical phenotype. Pathogenic CNVs are well documented in the literature and reported in databases in patients with similar phenotypes. Furthermore, population studies suggest

that over 99% of all benign CNVs are inherited; therefore, inherited CNVs are less likely to be pathogenic than *de novo* ones. However, presence of a CNV in one of the parents does not necessarily exclude pathogenicity (21).

Next Generation Sequencing analysis applied to inherited diseases

In the recent years, the development of NGS-based technologies has introduced genome-level sequencing into the clinical practice. A number of genetic disorders have overlapping clinical manifestations; therefore, clinical observation may not be sufficient to identify the gene that needs to be analyzed. Differential diagnosis has been tremendously improved by NGS analysis of panels of genes that cause diseases with partially overlapping clinical conditions; this has also led to the identification of patients with multiple variants contributing to the observed phenotype. However, in some conditions the number of possible causative genes can be extremely large: therefore, other strategies may be used. Whole-genome sequencing (WGS), consisting in the sequencing of the entire genome, and whole-exome sequencing (WES), consisting in the sequencing of all the coding regions, have become less expensive and technically feasible and represent the test of choice for these conditions (22). WES allows sequencing of exons, that include 85% of all the disease-causing mutations; on the other hand, WGS allows the identification of variants in regulatory regions; however, evaluation of their clinical significance and reporting is more difficult and time-consuming. For clinical conditions caused by a large number of genes,

WES has replaced gene panels analysis; in fact, after WES, variant analysis can be restricted to the desired panels of genes for detection of mutations in established disease-genes. In patients that lack causative pathogenic variants, analysis can subsequently be carried out on the entire exome. As described for CNVs, variants identified by NGS can also be classified as benign, likely benign, variant of uncertain significance (VOUS), likely pathogenic, or pathogenic.

NGS-based analyses require specific set-up in the diagnostic laboratory: data storage has to be carefully planned and access to genomic data needs to be restricted to specific operators. In addition to the technical laboratory procedures, data analysis and evaluation are time-consuming and require experienced operators. Recently, software certified for diagnostic purpose is available for data analysis and mutation detection: however, experienced operators are still required for careful data evaluation.

REEVALUATION OF MOLECULAR DIAGNOSTICS DATA

Clinical value

Data obtained with genomic screening methodologies, such as CGH-array and NGS, are subject to change in results interpretation over time for the accumulation of new knowledge and the identification of new disease/gene relations (Figure 1). In fact, a VOUS can subsequently be reclassified as pathogenic or benign after additional studies. In addition, even the significance of specific

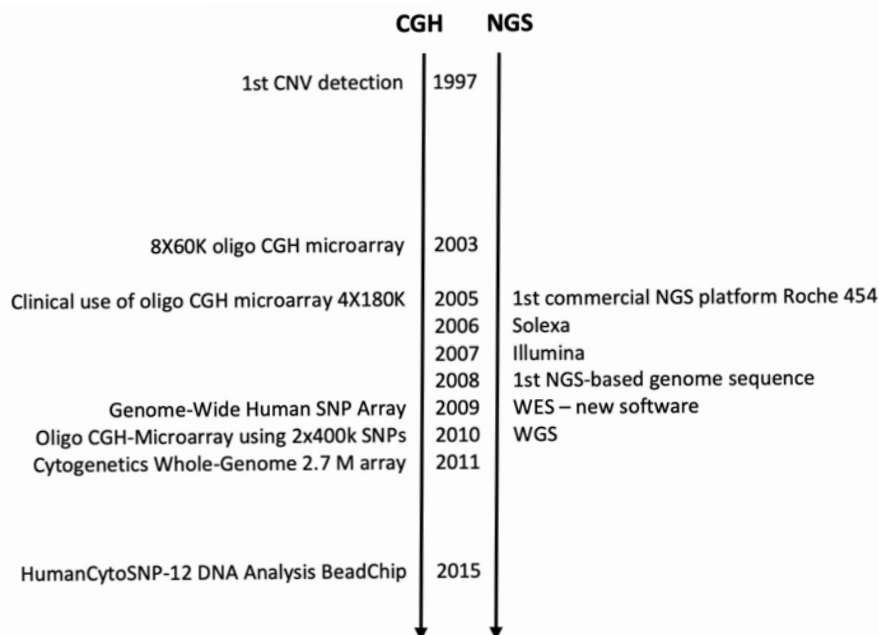


Figure 1

Major advances in the development of NGS and CGH methodologies and analyses of data generated with these technologies. After 2010, technological improvements and new and certified analysis pipelines have significantly modified clinical application of these methodologies.

CGH, comparative genome hybridization; NGS, next generation sequencing

pathogenetic mutations can vary with the development of novel therapeutic strategies that may lead to possible medical actions. In fact, development of novel genetic and pharmacological therapies has called for medical actions on patients diagnosed many years earlier with “classical” technique. One paramount example is the case of mutations in cystic fibrosis patients. To date, about 2 000 genetic variants in the *CFTR* gene are known, of which only about 400 have been shown to be pathogenetic. Since 2012, new drugs have been approved to correct and improve the function of the *CFTR* protein in a mutation-dependent manner. This makes it necessary to reevaluate a huge number of variants to clearly establish their pathological effect and to establish their response to treatment with new *CFTR* protein modulators. A great contribution to solving these issues comes from the development of protocols for functional characterization and assessment of responsiveness to drugs. If this has been possible in cystic fibrosis, thanks to the availability of *ex vivo* cellular models that allow this type of analysis (23,24), much still needs to be done for other pathologies where it is not always easy to obtain from patients’ samples that can be used for drug testing and variant characterization (e.g., neuronal disease, polycystic kidney and so on).

As mentioned, CGH-array analysis can identify CNVs whose clinical significance may change over time: identification of a variant in a significant number of patients and, conversely, its absence in the unaffected population may indicate causality or strong contribution to the development of a particular disease. Similarly, variants identified by NGS are, at first, often classified as VOUS until further evidence of pathogenicity *in silico*, *in vitro*, in animal models or in patients are accumulated allowing a correct classification.

Change of classification of variants identified by NGS or CGH-array can have a relevant clinical impact for patients. Identification of the pathogenicity of a variant can be, in fact, extremely relevant for family planning of future pregnancies even in absence of specific therapies, opening the way to questions that include ethical issues especially when penetrance and expressivity of the molecular alteration is uncertain. On occasions, however, a variant reclassified as pathogenic may be medically actionable, therefore changing the clinical history of the patient. Therefore, periodic reevaluation of the significance of variants can have an impact on a number of patients. Although, at first, periodic reassessment of the significance of variants can probably have an impact on a small number of patients, nevertheless, the clinical significance in these few cases has the potential to be extremely relevant, especially since as statistics and studies grow, so does the relationship to possible choices in individual cases.

Economical, legal and ethical issues in re-evaluation and retesting in molecular diagnostics

We can state, at present, that periodic reevaluation of variants is a service that a diagnostic laboratory can and should provide, and it is clear that, given the “public”

impact of such health services, decisions cannot be postponed for long. Patients’ data can be reevaluated simply updating the clinical classification of variants previously identified as VOUS: this type of data analysis is well defined and confined to a small number of variants per patients, therefore requires a reasonable effort for the diagnostic laboratory, obviously depending on the number of the diagnoses released. Case reevaluations are definitively more expensive and time-consuming, but they can indeed provide clinical information of high significance.

However, a number of issues should be clarified and possibly defined with legislative interventions to regulate laboratory policies concerning data reevaluations. Clinical significance of variants is likely to be updated for the next decade or more: therefore, periodic data reevaluation should be an integral part of the tests and clearly specified in the informed consent at sample collection. Reevaluation of variants or cases should be added as part of the cost of a test: at present, at least in the Italian healthcare system, these costs are not included and therefore, not reimbursed to the diagnostic laboratory; discussion at governmental level, whether national or regional, is therefore required. In addition, reevaluation is not usually included in the informed consent and, therefore, a laboratory should receive a specific authorization prior to communicate new evidence; for the same reason, a mechanism for the patients to opt out and not receive further information needs to be devised.

The diagnostic laboratory could add policies for periodical variant reclassification or case reanalysis and can therefore become the actual promoter. Reevaluation can be periodical (every 2-5 years) or, as the American College of Medical Genetics suggests, when a new resource or database becomes available or new methodologies for data analysis are devised or, finally, when new disease/gene associations are discovered (25). Results of case reevaluations should be sent then to the referring physicians or directly to the patients.

Reevaluation could be requested also by the referring physicians, especially when new clinical manifestations appear in the patient; in this case, specific reasons for granting such requests should be defined as well as the applicable costs. In addition, patient retesting with a novel methodology should be considered if the laboratory test had been performed many years earlier; in fact, both CGH-array and NGS have significantly progressed not only in data analysis pipelines but also in the actual testing methodologies. However, cost/benefit ratio should be evaluated considering the patient disease and the possible medical actionability.

Variant reclassifications and case reevaluations present an additional hidden cost: data storage. While storage of CGH-array data is usually well within the capability of a diagnostic laboratory, NGS data require a specific set-up. Primary NGS sequencing files (fastq) and alignments result files (.bam) need gigabytes of space; on the other hand, variant lists are relatively small. Primary data should be maintained for legal reason for an appropriate amount of time (5 years at least); variant

reclassification and case reanalysis can be performed on the files containing data about the variants or, eventually, keeping the significant alignment files. However, data storage should be considered when defining costs of the analyses in both private and public settings, since the growing societal tendency to organize itself is based on big data. In this sense, the problem addressed here is a practical correlate of a historical trend with a definitive impact on biological sciences. A considerate possibility could be the set-up of regional or national databases where data could be uploaded and safely stored: informatic security can, in fact, be a major problem for many laboratories and can definitively be addressed more efficiently with centralized storage. Development and running of such databases should be under governmental control and should also benefit from the expertise of the major research and diagnostic institutes involved in NGS. Legislative decisions would be required to define proper access to the resource and use of the data, perhaps even at international level. Actors requiring data reevaluation (patients, tutor or referring physician) should also be clearly addressed by the legislator; types of reevaluations, costs and communication between diagnostic laboratory and counterpart should be defined as well.

CONCLUSIONS

The -omics era is characterized by collection of an enormous amount of informatic data and periodic reassessment of the significance of laboratory findings. Therefore, the present considerations will soon apply to other types of analysis, such as untargeted metabolomics, in terms of data storage and reevaluation; addressing in a timely manner all these issues on economic, legal and ethical point of view will definitively provide benefit for patients.

From a more strictly ethical point of view, the issues offered for debate cannot be considered irrelevant. There is a general consent on the communication of medically actionable data to the patients: implications of the data for the patient and for the health care personnel must be clarified. To this end, communication of molecular diagnostics data based on clarity is necessary, also at the aim of motivating and improving therapeutic adherence. These issues are of paramount relevance to improve the patient/physician relationship and leave no room for lack of understanding.

Relationship between big data and their impact on individuals focuses on philosophical categories such as free-will and control, opening new scenarios in the relationship between patients and disease. In addition, NGS data storage introduce a new meaning of bio-banking. The first biobanks were born with the aim of collecting biological samples for specific research projects; however, in recent years, these have changed into real “deposits”, economically supported by governments and institutions. Individual genomic data introduces a new meaning of biobanks, that has gone hand in hand with the progress of the scientific world.

Many ethical and legislative aspects must revolve around the theme of the new concept of biobanks of the

future. Nevertheless, the moral imperative to be placed at the basis of the very activities of study, knowledge and care must remain strong: man always as an end and never as a means. In order to avoid dangerous drifts, it will be necessary to have the human being as an ever-present perspective, never forget the fundamental motive of research in biological, human and applied sciences (26,27).

Ethical issues will be increasingly present in management of genomic data. Genomic or biological sample collection will always deal with human samples, invading individual autonomy or limiting self-control and, consequently, raising a number of ethical questions (28). For these reasons, it will be very important to provide researchers with an up-to-date review of the literature on bio-banking ethics in a systematic way, to document the latest consensus on ethical issues in bio-banking and to highlight emerging issues. All of this should stimulate policymakers and legislators to create an appropriate legal framework for genomic research (29).

More generally, the role of public organization become extremely relevant for a transparent control of genomic data. As it happens in other areas, in modern society ownership or simple knowledge of large amount of data is a source of wealth and social control (direct and indirect); therefore, actions are necessary to prevent or limit the danger of monopolies of genomic data, since the jurisprudence is not always able to keep up with technological changes. In addition, it would also be relevant to determine the level of control of genomic data (local, national or at European Union level) and right of access to it. These decisions will eventually impact in a major way academic and industrial research, as well as patients' privacy and rights towards generated data.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Bentley DR. Whole-genome re-sequencing. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:545-52.
2. Chambers DC, Carew AM, Lukowski SW, et al. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing. *Respirology* 2019;24:29-36.
3. Tropini C, Earle KA, Huang KC, et al. The gut microbiome: connecting spatial organization to function. *Cell host microbe* 2017;21:433-42.
4. Arumugam A, Agullo P, Boopalan T, et al. Neem leaf extract inhibits mammary carcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 2014;15:26-34.
5. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 2017;474:1823-36.
6. Perry RJ, Peng L, Barry NA, et al. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature (Internet)* 2016;534:213-7. <https://www.nature.com/articles/nature18309>
7. Mills S, Stanton C, Lane JA, et al. Precision nutrition and the microbiome, part i: current state of the science. *Nutrients* 2019;11:923.

8. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research* 2020;30:1-15.
9. Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, et al. Microbiome and anticancer immunosurveillance. *Cell* 2016;165:276-87.
10. Tripodi L, Passariello M, D'Argenio V, et al. Evaluation of the antiproliferative effect of *Bifido bacterium longum* BB-536 in solid tumor cell lines, co-cultured with murine splenocytes. *Biochim Clin* 2021;45:242-7.
11. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Isme J* 2012;6:1621-4.
12. Lee M, Chang EB. Inflammatory bowel diseases (ibd) and the microbiome-searching the crime scene for clues. *Gastroenterology* 2021;160:524-37.
13. Yi M, Yu S, Qin S, et al. Gut microbiome modulates efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Hematol Oncol* 2018;11:47. <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-018-0592-6>
14. Georgiou K, Marinov B, Farooqi AA, et al. Gut microbiota in lung cancer: where do we stand? *Int J Mol Sci* 2021;22:10429.
15. Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* 2011;12:363-76.
16. Shaikh TH. Copy number variation disorders. *Curr Genetic Medicine Reports* 2017;5:183-90.
17. Brothman AR, Dolan MM, Goodman BK, et al. College of American Pathologists/American College of Medical Genetics proficiency testing for constitutional cytogenomic microarray analysis. *Genet Med* 2011;13:765-9.
18. Tsuchiya KD, Shaffer LG, Aradhya S, et al. Variability in interpreting and reporting copy number changes detected by array-based technology in clinical laboratories. *Genet Med* 2009;11:866-73.
19. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics Medicine Official J Am Coll Medical Genetics* 2020;22:245-57.
20. Gurbich TA, Ilinsky VV. ClassifyCNV: a tool for clinical annotation of copy-number variants. *Sci Rep-uk*. 2020;10(1):20375.
21. Tizaoui K. De novo vs. inherited copy number variations in multiple sclerosis susceptibility. *Cell Mol Immunol* 2018;15:812-4.
22. Sun H, Shen XR, Fang ZB, et al. Next-Generation Sequencing Technologies and Neurogenetic Diseases. *Life* 2021;11:361.
23. Terlizzi V, Amato F, Castellani C, et al. Ex vivo model predicted in vivo efficacy of CFTR modulator therapy in a child with rare genotype. *Mol Genetics Genom Medicine* 2021;9:e1656.
24. Amato F, Scudieri P, Musante I, et al. Two CFTR mutations within codon 970 differently impact on the chloride channel functionality. *Hum Mutat* 2019;40:742-8.
25. Deignan JL, Chung WK, Kearney HM, et al. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2019;21:1267-70.
26. Salvaterra E, Lecchi L, Giovanelli S, et al. Banking together. *Embo Rep* 2008;9:307-13.
27. Favalli C, Galletti M. Biobanche e informazioni genetiche. *Problemi etici e giuridici*. Aprilia (LT): Aracne 2011.
28. Cambon-Thomsen A, Rial-Sebbag E, Knoppers BM. Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks. *Eur Respir J* 2007;30:373-82.
29. Caulfield T, McGuire AL, Cho M, et al. Research ethics recommendations for whole-genome research: consensus statement. *Plos Biol* 2008;6:e73.

Sistema POCT per la determinazione su sangue intero della troponina cardiaca I ad alta sensibilità: quale valore nel territorio?

Lucio Marchioro^{1,2}, Monica Maria Mion¹, Martina Zaninotto^{1,2}, Mario Plebani^{1,2}

¹ U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università di Padova

² QI.LAB.MED. Padova

ABSTRACT

POCT system for the determination of high sensitivity cardiac troponin I: the value in the territory.

The Italian National Recovery and Resilience Plan (NRRP) provides resources for the activation for over a thousand Community Houses that will serve as permanent points of reference for the population with the aim to guarantee both the prevention activity and the care of patients. These structures need to be provided with Information Technology (essential for the implementation of telemedicine), an adequate multi-specialty instrumental equipment (radiology, clinical laboratory) and a multidisciplinary team of medical specialists, paediatricians, nurses and other health professionals. In this context, the clinical laboratory activity takes on a strategic role especially in the diagnosis of the acute myocardial damage (AMI) which is fundamentally based on the determination of Troponin I or T and no longer on instrumental investigations, such as ECG. High quality POCT devices are currently available on the market for the determination of Troponin I (and T) with high sensitivity methods characterized by adequate costs for the diagnostic efficacy they should guarantee. Recently, the POCT system QuidelTriage High Sensitivity Troponin I test has been evaluated using 75 whole blood samples from patients. Overall, the outcome of the trial was satisfactory and corresponded to the quality and performance specifications recommended by AACC and IFCC for a method that should assure an elevated level of diagnostic accuracy. The tested POCT device was effective in the management of patients with suspected AMI using either single cut-off value or 0/1 hour algorithm. This demonstrates the important contribution that POCT devices can offer for of early diagnosis and monitoring of chronic disease

Parole chiave: POCT, hs-Troponina I, medicina territoriale

INTRODUZIONE

Con il Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR) sono stati destinati importanti investimenti per un nuovo percorso organizzativo dei Servizi Sanitari di prossimità (a cominciare dal potenziamento dei servizi domiciliari) e per una maggior utilizzazione della telemedicina (1). Il PNRR prevede l'attivazione di oltre un migliaio di Case di Comunità che saranno realizzate, utilizzando sia strutture nuove che già esistenti, per costruire un punto di riferimento permanente per la popolazione, con lo scopo di garantire sia l'attività di prevenzione sia la presa in carico dei pazienti all'interno della comunità di riferimento.

Le Case di Comunità oltre alla disponibilità di un'infrastruttura informatica (indispensabile per la

concretizzazione della telemedicina) e di spazi ambulatoriali (ad esempio un punto prelievi), dovranno essere equipaggiate con un'adeguata dotazione strumentale polispecialistica (ad esempio radiologia, laboratorio analisi) ed avere la disponibilità di un gruppo multidisciplinare di medici specialisti e di medicina generale, pediatri di libera scelta, infermieri e altri professionisti della salute che opereranno al loro interno (1).

A tutto ciò si aggiungeranno le nuove strutture degli Ospedali di Comunità, pensati per il potenziamento dell'offerta delle cure intermedie e, in particolare, per ricoveri brevi e interventi sanitari a media e bassa intensità di cura anche con lo scopo di ridurre, ad esempio, accessi impropri al pronto soccorso (1).

In questo quadro, anche la diagnostica di laboratorio acquista un ruolo strategico a supporto della medicina

Corrispondenza a: Lucio Marchioro, U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università di Padova, Via Nicolò Giustiniani, 2, 35129 Padova, Email: lucio.marchioro@aopd.veneto.it

Ricevuto: 17.05.2022

Revisionato: 22.05.2022

Accettato: 28.06.2022

Pubblicato on-line: 13.07.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.048

generale e specialistica. Infatti la Medicina di Laboratorio non si limita solo a fornire un risultato di supporto alla diagnosi clinica ma consente, attraverso la disponibilità di esami diagnostici specifici, di supportare il clinico nella scelta di un trattamento precoce e mirato e di attuare misure preventive e predittive per il mantenimento della salute e del benessere del paziente (2).

Il concetto del valore centrale dell'esame di laboratorio, recentemente ribadito da numerosi autori (3-6) anche in ragione di quanto visto e avvenuto nel corso della pandemia da SARS-CoV-2, rappresenta un paradigma che va esteso ad altri ambiti della moderna medicina. L'esempio più eclatante è rappresentato dalla diagnostica del danno acuto miocardico che si basa fondamentalmente sulla determinazione di un biomarcatore di elevata cardiospecificità, le troponine I o T, e non più solo su indagini strumentali (in particolare l'elettrocardiogramma).

L'adeguata dotazione strumentale, più volte richiamata nel PNR, al giorno d'oggi non rappresenta un problema in quanto l'evoluzione tecnologica ha consentito lo sviluppo e l'utilizzo non solo di metodi e di strumentazione automatizzata di alta funzionalità e qualità ma anche di dispositivi Point of Care Testing (POCT) di dimostrata affidabilità (7). Rimanendo nell'ambito delle malattie cardiovascolari, ne sono esempio le troponine I e T determinate con metodi ad alta sensibilità (hs-TnI e hs-TnT) che sono caratterizzate sia da provata rilevanza clinica che dalla disponibilità di metodi con prestazioni analitiche di ben definita ed elevata qualità, con tempi di esecuzione rapidi e costi ragionevoli (8-12). Il vantaggio clinico più importante dei metodi ad elevata sensibilità è la riduzione del tempo necessario per effettuare una diagnosi di inclusione/esclusione di patologia ischemica acuta (13).

Da più di due decenni, sempre sul tema dei marcatori cardiaci, Plebani et al. (14) hanno riflettuto sull'avvento dei cosiddetti Near-Patient-Test (NPT), riferendosi a quegli esami di laboratorio effettuati vicino o al letto del paziente, generalmente non eseguiti da personale di laboratorio, quindi senza specifiche competenze, e privi di un piano organizzativo per l'assicurazione di qualità dell'attività svolta. A quel tempo (1999), i laboratori ospedalieri erano impreparati relativamente alla gestione di quelle nuove tecnologie non solo relativamente alla qualità necessaria per i risultati forniti dai nuovi metodi, ma anche ai loro costi (14). Con l'evoluzione delle conoscenze e delle tecnologie avvenuta negli anni più recenti, sono attualmente disponibili in commercio dispositivi POCT di alta qualità, caratterizzati da costi adeguati per l'efficacia diagnostica che garantiscono (7). In questo contesto si inserisce il Quidel TriageTrue High Sensitivity Troponin I test (Quidel Cardiovascular Inc., San Diego, CA, USA) che è un immunodosaggio in fluorescenza autocalibrante, applicato al dispositivo POCT QuidelTriage®MeterPro per la determinazione quantitativa della Troponina I con metodo ad alta sensibilità in campioni di sangue intero e plasma EDTA, di provata affidabilità sia analitica che diagnostica (15), che è oggetto della presente riflessione.

ESPERIENZA PERSONALE

Com'è noto (16-18), i metodi definiti ad alta sensibilità per essere definiti tali, devono essere in grado di misurare i livelli circolanti del biomarcatore cardiaco nella maggior parte dei soggetti sani di entrambi i sessi, come previsto nelle raccomandazioni dell' "American Association for Clinical Chemistry" (AACC) e dell' "International Federation of Clinical Chemistry" (IFCC) secondo due criteri fondamentali (19). Il primo criterio stabilisce che il metodo misuri il valore soglia per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA), definito come il valore del 99° percentile della distribuzione del biomarcatore nella popolazione sana di riferimento (URL), con una imprecisione espressa come coefficiente di variazione (CV) $\leq 10\%$; il secondo criterio stabilisce che il metodo misuri i livelli del biomarcatore al di sopra del valore della sensibilità del metodo (espressa come Limit of Detection, LoD) in più del 50% dei soggetti di una popolazione di riferimento che includa individui apparentemente sani di entrambi i sessi (16,18). Tradizionalmente, i metodi POCT per la misura delle troponine cardiache non erano utilizzabili per la diagnosi di IMA senza persistente soprallivellamento del tratto ST (NSTEMI) perchè non erano in grado di soddisfare le specifiche di qualità raccomandate dalle linee guida internazionali e solo di recente sono stati sviluppati metodi POCT con tali caratteristiche di prestazione (20-23).

L'imprecisione analitica, soprattutto alle basse concentrazioni (non solo a livello dei valori decisionali definiti per l'individuazione del danno miocardico) ma anche a concentrazioni inferiori, ovvero a livello del limite di quantificazione (LoQ, minima concentrazione dell'analita che può essere determinata con un CV $\leq 20\%$) è un altro aspetto cruciale delle prestazioni analitiche di un metodo per la misura delle cTn perchè possa definirsi ad alta sensibilità. Questo infatti risulta decisivo all'interno delle nuove strategie di rule-in o rule-out, che i nuovi protocolli diagnostici si propongono di attuare, ovvero nell'applicazione di nuovi algoritmi diagnostici per l'individuazione del danno miocardico acuto basati su una sola determinazione del biomarcatore (al momento della presentazione, t_0) o sulle variazioni di concentrazioni del biomarcatore a distanza di un'ora dalla presentazione presso la struttura sanitaria assistenziale (delta 0-1 ora).

Valutazione del POCT hs-TnI Quidel TriageTrue

La valutazione del sistema Quidel TriageTrue hs-TnI/Triage®MeterPro è avvenuta utilizzando solo sangue intero come matrice. La scelta del tipo di campione è avvenuta ritenendolo il più adeguato per una eventuale localizzazione del dispositivo presso strutture sanitarie del territorio [Residenze Sanitarie Assistite (RSA), Case della Comunità e Ospedali di Comunità] oltre che in Servizi di Pronto Soccorso non adeguatamente supportati da un laboratorio analisi. La matrice sangue intero si presta infatti, rispetto al plasma, ad un suo più favorevole oltre che appropriato impiego in queste specifiche strutture sanitarie. Nel sistema POCT in valutazione, una definita quantità di sangue intero o di plasma EDTA (175 μ L)

viene dispensata nell'area specifica del dispositivo con un' apposita pipetta o tramite il dispositivo VacuDrop (solo in caso di sangue intero); il campione reagisce con i coniugati dell'anticorpo fluorescente. In presenza di sangue intero, gli eritrociti sono separati dal plasma da un filtro interno al dispositivo. La miscela di reazione (costituita dai complessi coniugati fluorescenti) migrando per capillarità raggiunge la zona di misura specifica per la troponina I. Integrati nella zona di misura, sono presenti un controllo positivo ed uno negativo che fungono da controllo di qualità della determinazione effettuata.

Sono stati utilizzati 75 campioni di sangue intero (EDTA-K₂, 35 maschi e 40 femmine) e condotto prove di imprecisione con concentrazioni prossime al livello decisionale per danno miocardico (99° percentile; maschi: 25,7 ng/L, femmine: 14,4 ng/L come dichiarato dal produttore) sia utilizzando campioni da paziente che materiali di controllo forniti dal produttore (Quidel TriageTrue High Sensitivity Troponin I Control 1 e Control 2). Sono state altresì condotte prove di confronto con il metodo in uso nel laboratorio (ARCHITECT Plus-Abbott con il calcolo della concordanza e della discordanza tra risultati) e di verifica della stabilità del campione dal momento del prelievo all'esecuzione della misura (4 ore come dichiarato dal produttore) su due campioni aventi concentrazioni medie pari a 2,4 ng/L e 36,8 ng/L. Lo studio di possibili interferenze (lipemia, fattore reumatoide, anticorpi eterofili) su tutti i campioni analizzati ha dato esito negativo, ovvero non sono stati osservati falsi incrementi o decrementi del biomarcatore rispetto al metodo di confronto nei campioni con queste caratteristiche.

All'interno della sperimentazione clinico-analitica, l'unica caratteristica che non è stato possibile valutare è stata l'esattezza, in quanto al momento non sono ancora presenti sul mercato programmi di VEQ per la troponina I

ad alta sensibilità che considerino come matrice il sangue intero.

L'uso dello strumento, si è dimostrato semplice e intuitivo, con tempi di inizializzazione rapidi (circa 200 secondi) e tempi di risposta di 17 minuti (conformi con quanto atteso per gli strumenti POCT). Le prestazioni analitiche si sono dimostrate adeguate ai metodi ad alta sensibilità (15). Le prove di imprecisione hanno infatti dimostrato coefficienti di variazione soddisfacenti (CV% 5,5 e 6,7, rispettivamente alle concentrazioni di 20,5 ng/L per i maschi e 13,2 ng/L per le femmine), confrontabili con quelli dichiarati dal produttore e ampiamente inferiori a quanto richiesto dal primo criterio (CV ≤10%) per la definizione di un metodo ad alta sensibilità per la determinazione della troponina cardiaca (19). In ambedue i campioni analizzati, il numero di replicati è stato di n=8 in modo da rispettare l'indicazione del produttore riguardo la stabilità del campione e cioè quella di eseguire la determinazione della troponina entro 4 ore dal prelievo. Anche sui materiali di controllo Control 1 e Control 2, sui quali è stata verificata l'imprecisione tra-giorni (n=5) sono stati ottenuti risultati soddisfacenti: CV%= 1,0 per il Livello 1 (x_m = 27,6 ng/L) e 4,9 per il Livello 2 (x_m = 535,6 ng/L).

E' stata inoltre verificata l'imprecisione osservata ad una concentrazione (x_m = 2,4 ng/L) prossima se non inferiore a quella dichiarata dal produttore (2,8 ng/L) come LoQ che è risultata confrontabile (CV= 21,1%) (Tabella1)

Il confronto tra il dispositivo POCT e il metodo utilizzato sia in urgenza che in routine nel laboratorio, effettuato su 71 campioni (4 campioni sono stati esclusi dal calcolo statistico in quanto superiori alla linearità del metodo POCT) compresi in un intervallo di concentrazione 1,7-762,9 ng/L, ha generato una retta di regressione secondo Passing-Bablok di $y = 0,92x + 0,49$ (95%IC pendenza = 0,81 - 1,03, 95%IC intercetta = da -0,99 a 1,48)

Tabella 1

Principali risultati ottenuti con hs-cTnI TRIAGE True

	Dichiarati dal produttore		Ottenuti nello studio		
	Media (ng/L)	CV%	n	Media (ng/L)	CV%
LOQ	2,8	20	8 (replicati)	2,4	21,1
Imprecisione al 99° percentile, (Maschi)	25,7	5,4	5 (replicati)	20,5	5,5
Imprecisione al 99° percentile (Femmine)	14,4	5,9	5 (replicati)	13,2	6,7
CQI Livello 1 (plasma)	26,0	5,1	5	27,6	1,0
CQI Livello 2 (plasma)	523,0	4,6	5	535,6	4,9

LOQ, Limite di Quantificazione; CQI, Controllo di Qualità Interno; CV, Coefficiente di Variazione.

(Figura 1) con un bias statisticamente non significativo di -3,1% (95%IC= da -12,6 a 6,5) (secondo Bland-Altman) e con un intervallo che comprende il 95% delle differenze di -98,3/-65,6 (basso) e di 59,5/92,2 (alto) (Figura 2). Sullo stesso numero di campioni l'analisi tramite test di Pearson ha fornito una $r = 0,96$ ($p < 0,0001$). Il grado di concordanza dei risultati tra metodi su campioni appartenenti a soggetti di sesso femminile è stato pari a 91% mentre quello sui soggetti di sesso maschile è stato pari a 80% (85% sul totale). Tale risultato è stato confermato con il calcolo

della Kappa di Cohen ($k = 0,709$, $95\%IC = 0,553-0,865$, $p < 0,001$).

E' stata infine verificata la stabilità dell'analita nel campione di sangue intero oltre le 4 ore, tempistica che il produttore indica come limite massimo di esecuzione del test dal momento del prelievo.

In ambedue i campioni utilizzati ($x_m = 2,4$ e $36,8$ ng/L) abbiamo riscontrato che il campione rimaneva stabile oltre la 6^a ora dal prelievo con CV di 21,1% e 8,5% rispettivamente, condizione utile in caso di richiesta di ripetizione della misura.

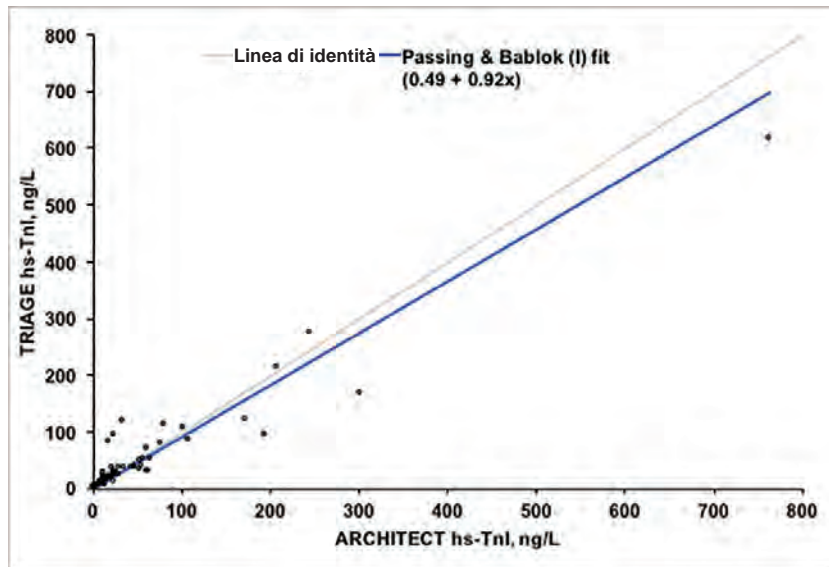


Figura 1
Confronto tra metodi: regressione di Passing & Bablok

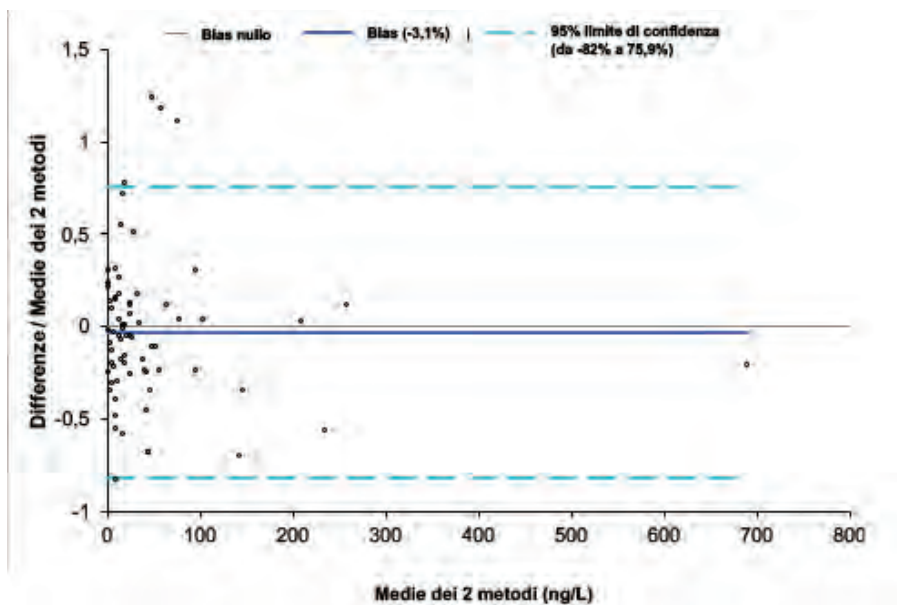


Figura 2
Confronto tra metodi: grafico di Bland-Altman

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Recentemente Hengel et al, nell'ambito della diagnostica in corso di pandemia da SARS-Cov-2, ha evidenziato l'importanza che assumono i dispositivi POCT in aree e territori remoti o comunque lontani dai laboratori centralizzati (24) asserendo che gli esami decentralizzati, come modello, dovrebbero essere presi in considerazione per quelle comunità o realtà maggiormente e socialmente vulnerabili (ad esempio, i residenti nelle RSA) consentendo risposte rapide utili per la valutazione del loro stato di salute, riducendo al minimo gli esiti negativi per i pazienti e gli oneri per le strutture sanitarie secondarie e terziarie (24). Non occorre sottolineare che la digitalizzazione gioca un grande ruolo in questo contesto in quanto c'è necessità di supportare adeguatamente la comunicazione e il collegamento tra la struttura centralizzata e quelle decentrate in ambiti che spaziano dalla governance alla gestione del rischio e verifica della qualità analitica, fino ad arrivare all'analisi del rapporto costo/beneficio (24). Che la diagnostica sia eseguita nel laboratorio centralizzato, in un laboratorio satellite o al letto del paziente, devono essere attuati i medesimi protocolli di assicurazione di qualità (14) ed utilizzati appropriati materiali di controllo. Su questo punto il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), nella linea guida QC, C24-A3 (25) dichiara chiaramente che *"il numero di livelli e la concentrazione dei materiali di controllo dovrebbero essere adeguati alla determinazione delle corrette prestazioni del metodo nell'intervallo di misura di interesse"*. Per la maggioranza degli analiti sono raccomandati come minimo due livelli diversi di concentrazione, corrispondenti a livelli clinicamente utili o assimilabili ai valori riscontrati nei campioni dei pazienti. Questa affermazione diventa tanto più importante quanto più è elevato il valore diagnostico dell'esame, come nel caso della hs-TnI. Per tale motivo, la mancata disponibilità di schemi e materiali di VEQ per dispositivi POCT che utilizzano sangue intero per la determinazione delle cTn rappresenta una criticità che dimostra come tuttora non siano ancora superate tutte le problematiche descritte nel passato (8) sull'utilizzo di questi sistemi.

Ciononostante e con la speranza che la lacuna citata poco sopra venga al più presto colmata, il sistema POCT QuidelTriageTrue hs-TnI/Triage®MeterPro, oggetto della nostra valutazione, ha dimostrato di soddisfare quelle specifiche di qualità precedentemente evidenziate (19) affrontando con successo quel salto di qualità che alcuni autori avevano identificato come una vera sfida (22) e dimostrandosi efficace nella gestione dei pazienti con sospetto IMA sia con singolo livello decisionale che con algoritmo 0/1 ora, come recentemente dimostrato da altri autori (23). Comunque la parziale mancanza di adeguati materiali di controllo non pone in secondo piano il grande contributo che i dispositivi POCT possono offrire in termini di diagnosi precoce in caso di eventi acuti. Infatti, l'implementazione clinica dei sistemi POCT per hs-TnI assicura tempi di risposta più rapidi (migliore Tempo di Risposta) facilitando così la gestione dei pazienti con dolore toracico (26), non solo in caso di eventi acuti

ma anche nel monitoraggio di patologie croniche come il diabete, situazioni cliniche che frequentemente sono presenti nelle strutture socio-sanitarie contemplate dal PNRR. Infine, i dispositivi POCT per hs-TnI possono aprire alla possibilità di una diagnosi decentrata di danno miocardico ed infarto, sia nelle cure primarie che in altri contesti clinici più remoti (26).

BIBLIOGRAFIA

1. CGM – Xmedical. <https://www.softwaregestionalemedico.it/News/cgm-xmedical-informa>, 5 luglio 2021 (ultimo accesso: Aprile 2022).
2. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
3. Comunicato Stampa - Il valore della diagnostica per la sostenibilità del Sistema Salute. <https://www.roche.it/it/media/comunicati-stampa---news/contentitore-news/Il-valore-della-diagnostica-per-la-sostenibilita-del-Sistema-salute.html>
4. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during corona virus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1063-9. (ultimo accesso: aprile 2022)
5. Lippi G, Plebani M. A modern and pragmatic definition of laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1171.
6. Ashorff L, Hoag G, Ivany C. Laboratory medicine: the exemplar for value-based healthcare. *Health Manage Forum* 2021;34:175-80.
7. Rampoldi E, Patrucco G, Casati M, et al. Principi per l'implementazione e la gestione del point-of-care testing (POCT): indicazioni essenziali. *Biochim Clin* 2021;45:312-26.
8. Zaninotto M, Mion MM, Novello E, et al. New biochemical markers: from bench to bedside. *Clin Chim Acta* 2007;381:14-20.
9. Clerico A, Zaninotto M, Dittadi R, et al. Utilizzo in Pronto Soccorso dei metodi ad alta sensibilità per le troponine cardiache per i pazienti con sospetto di infarto acuto del miocardio senza soprassivellamento del tratto ST. *Biochim Clin* 2020;45:412-26.
10. Aspromonte N, Zaninotto M, Padoan A, et al. Valutazione del rischio cardiovascolare e del danno cardiaco asintomatico nella popolazione generale utilizzando la misura della troponina cardiaca con metodi ad alta sensibilità. *Biochim Clin* 2020;44 Suppl.1 S086-96.
11. Apple FS, Schulz K, Schimdt CW, et al. Determination of sex-specific 99th percentile upper reference limits for a point-of-care high sensitivity cardiac troponin I assay. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1574-8.
12. Apple FS, Fantz CR, Collinson PO, et al. Implementation of high sensitivity and point-of-care cardiac troponin assays into practice: some different thoughts. *Clin Chem* 2021; 67:70-8.
13. Vigolo S, Vettore G, Zaninotto M, et al. Il valore aggiunto delle troponine cardiache misurate con metodi ad elevata sensibilità: gli algoritmi diagnostici accelerati. *Monografia EsaDia* 2016;48:7-12.
14. Plebani M, Zaninotto M. Cardiac Markers: Centralized or Decentralized Testing? *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1113-7.
15. Cullen L, Collinson PO, Giannitis E. Point-of-care testing with high-sensitivity cardiac troponin assays: the challenges and opportunities. *Emerg Med J* 2022;0:1-6.
16. Clerico A, Giannoni A, Prontera C, et al. High-sensitivity troponin I: a new tool for pathophysiological investigation

- and clinical practice. *Adv Clin Chem* 2009;49:1-30.
17. Clerico A, Zaninotto M, Padoan A, et al. Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cTnI and cTnT: from theory to Practice. *Adv Clin Chem* 2019;93:239-62.
 18. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: a multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 19. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical Laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
 20. Collet JP, Thiele H, Barbato E, et al. The Task force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2021;42:1289-367.
 21. NICE. High-sensitivity troponin tests for the early rule out of NSTEMI. Diagnostics guidance. Published: 26 August 2020. www.nice.org.uk/guidance/dg40 (ultimo accesso: Aprile 2022)
 22. Apple FS, Collinson PO, Kavsak PA, et al. The IFCC Clinical Application of Cardiac Biomarkers Committee's Appraisal of the 2020 Esc Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Getting cardiac troponin right. *Clin Chem* 2021;64:730-5.
 23. Boeddinghaus J, Nestelberger T, Koechlin, et al. Early Diagnosis of Myocardial Infarction with Point-of-Care High Sensitivity Cardiac troponin I. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:1111-24.
 24. Hengel B, Causer L, Matthews S, et al. A decentralized point-of-care testing model to address inequities in the Covid-19 response. *Lancet Infect Dis* 2021;21:e183-90.
 25. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: principles and Definitions; approved guidelines, 3rd edition. CLSI document C24-A3. CLSI Wayne, PA, 2006.
 26. Clerico A, Zaninotto M, Plebani M. High-sensitivity assay for cardiac troponins with POCT methods. The future is soon. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1477-8.

Indicazioni per l'armonizzazione dell'intervallo terapeutico nel monitoraggio plasmatico dei farmaci antiretrovirali

Massimo Tempestilli^{1,2}, Simone Premaschi³, Bianca Maria Goffredo⁴, Jessica Cusato⁵ per il Gruppo di Studio SIBioC "TDM e Personalizzazione della Terapia"

¹UOSD Immunologia Cellulare e Farmacologia, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani" IRCCS, Roma

²UOS Professioni Sanitarie Tecniche, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani" IRCCS, Roma

³ASST di Pavia, Medicina di Laboratorio, Ospedale di Vigevano, Pavia

⁴Laboratorio di Malattie Metaboliche I.R.C.C.S. Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

⁵Laboratorio di Farmacologia Clinica e Farmacogenetica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino

ABSTRACT

Indications for the harmonization of the plasma therapeutic ranges in the antiretroviral drugs monitoring.

The treatment of HIV infection has evolved significantly since the advent of highly active antiretroviral therapy. As a result, a response rate of 90-95% now represents a realistically achievable target. Given this background, it is difficult to imagine the additional benefits that therapeutic drug monitoring (TDM) could provide in the management of HIV infection. However, some clinical situations, where the selection of the optimal antiretroviral therapy is challenging, have been identified. These include poorly compliant patients, suboptimal antiretroviral therapies (in terms of both efficacy and toxicity), polypharmacy with a high risk of drug-drug interactions, and different patient populations, such as pregnant women or pediatric patients. The aim of the present document is to provide indications relative to therapeutic ranges for the concentrations of antiretrovirals, obtained examining the available guidelines as well as other papers (including case reports). The application of TDM in selected clinical conditions may allow the identification of patients with non-optimal antiretroviral drug exposure (i.e. underexposure associated with the risk of treatment failure or overexposure associated with the risk of drug-related toxicity), allowing the the patient-specific drug treatment and a better therapeutic approach in HIV patients.

Parole chiave: farmaci antiretrovirali, TDM, HIV

LA TERAPIA ANTIRETROVIRALE

Dal 1995 l'infezione da HIV viene trattata con una terapia antiretrovirale di combinazione (cART) definita altamente attiva (HAART, highly active antiretroviral therapy) nella quale si utilizzano opportune associazioni di diversi farmaci. L'HAART ha consentito di ridurre significativamente la morbilità e la mortalità degli individui che sono stati infettati dal virus (1).

La terapia antiretrovirale nel paziente HIV+ ha due scopi principali: la soppressione virologica plasmatica (HIV-RNA non rilevabile) e il recupero della popolazione dei linfociti T Helper (CD4).

La cART ha un'eccellente efficienza nell'inibire la replicazione del virus che diventa non rilevabile nel plasma dei pazienti trattati ed in parallelo permette l'incremento

del conteggio dei linfociti CD4; di conseguenza il paziente HIV+ avrà un rischio molto ridotto di trasmissione dell'infezione e un recupero dell'assetto immunologico, con relativo abbassamento della possibilità di contrarre infezioni ed altre patologie HIV-correlate (2).

Purtroppo, nonostante la comprovata efficacia terapeutica, la cART non è in grado di eliminare completamente il virus dall'individuo; esso infatti persiste in alcuni compartimenti (detti reservoirs) cellulari in forma latente (per esempio cervello, tessuto linfoide, midollo osseo e/o nel tratto genitale). Alla sospensione della terapia, il virus si riattiva e determina la ricomparsa della viremia plasmatica. La cART è dunque una terapia che richiede una durata indefinita al momento approssimabile alla durata della vita (1,2).

Corrispondenza a: Massimo Tempestilli, UOSD Immunologia Cellulare e Farmacologia, UOS Professioni Sanitarie Tecniche, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani" IRCCS, Via Portuense 292, 00149 Roma. E-mail: massimo.tempestilli@inmi.it

Ricevuto: 05.04.2022

Revisionato: 22.04.2022

Accettato: 24.05.2022

Pubblicato on-line: 14.06.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.041

Attualmente sono disponibili circa 30 farmaci per il trattamento dell'infezione da HIV. Tali farmaci hanno differenti meccanismi di azione e sono suddivisibili in diverse classi (Tabella 1) (1-7):

- inibitori nucleosidici/nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI, Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor). I farmaci di questa classe sono stati i primi ad essere utilizzati nella terapia dell'infezione da HIV. Per poter svolgere la propria azione antiretrovirale devono essere convertiti nella forma polifosforilata attiva a livello intracellulare. Questi farmaci sono in grado di inibire il processo di replicazione del virus mediante il blocco della trascrizione dell'RNA virale in DNA virale; agiscono sostituendosi alle basi azotate durante la trascrizione, in modo che il DNA virale neoformato sia incompleto e quindi incapace di originare nuove particelle virali. Gli NRTI sono spesso definiti il "backbone" della cART perchè la maggior parte dei regimi contiene almeno due di questi farmaci;
- inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor). Anche questi, come i farmaci NRTI, sono inibitori della transcriptasi inversa, ma agiscono con un meccanismo diverso: si legano direttamente al sito attivo dell'enzima, bloccandone l'azione ed impedendo così che avvenga la formazione del DNA virale. Questi farmaci hanno una buona biodisponibilità ed una lunga emivita;
- inibitori della proteasi di HIV (PI, Protease Inhibitors). Sono i farmaci caratterizzati da una potente attività di blocco della replicazione virale. Questi farmaci agiscono nell'ultima fase del ciclo replicativo dell'HIV, inibendo la proteasi virale, un enzima che permette la maturazione delle nuove particelle virali, rendendole a loro volta infettanti. A causa della bassa biodisponibilità, i PI devono essere co-somministrati con agenti farmacopotenzianti/booster (ritonavir o cobicistat) che agiscono da inibitori delle isoforme citocromiali CYP3A4 e CYP3A5;
- inibitori della fusione/ingresso (EI, Entry Inhibitors). Agiscono nella fase dell'infezione durante la quale il virus si lega alla cellula bersaglio che poi andrà ad infettare. Sono in grado di legarsi a una proteina virale, impedendone il legame con la cellula e quindi

bloccandone l'ingresso;

- inibitori dell'integrasi (INSTI, Integrase Strand Transfer Inhibitor). Sono una delle più recenti classi di antiretrovirali introdotte. Questi farmaci inibiscono l'inserzione del DNA dell'HIV nel DNA umano per mezzo dell'enzima dell'integrasi. Inibendo l'integrasi da questa funzione essenziale, il farmaco limita l'abilità del virus di replicare e di infettare nuove cellule.

Le classi e i nomi dei farmaci antiretrovirali sono riportati nella Tabella 1.

I regimi di prima linea terapeutica raccomandati comprendono due analoghi NRTI assieme ad un terzo farmaco (NNRTI, PI, EI, INSTI) o, più recentemente, combinazioni duali (dolutegravir/lamivudina, dolutegravir/rilpivirina). I farmaci antiretrovirali di ultima generazione, usati in combinazione e spesso in singola compressa giornaliera, presentano alta efficienza nella soppressione virale (90-95%) e buona tollerabilità. Per le differenti opzioni terapeutiche che variano a seconda della tipologia di paziente, si rimanda a linee guida specifiche (SIMIT, Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali; DHHS, Department of Health and Human Services; EACS, European AIDS Clinical Society; BHIVA, British HIV Association) (4-7).

Criticità della terapia antiretrovirale

Tossicità

Ogni classe ed ogni farmaco anti-HIV è caratterizzato da un determinato potenziale di tossicità, il quale è talvolta associato a concentrazioni elevate di farmaco all'interno dell'organismo. Di seguito i più comuni eventi avversi ai farmaci antiretrovirali (8):

- acidosi lattica;
- problemi al sistema nervoso centrale e periferico;
- effetti avversi a carico del rene;
- alterazioni a carico dell'apparato muscolo-scheletrico;
- tossicità epatica;
- rash cutanei e reazioni di ipersensibilità;
- nausea e vomito;
- aumento del rischio cardiovascolare;
- redistribuzione del grasso corporeo;
- anomalie del metabolismo lipidico;
- aumento di peso.

Tabella 1

I farmaci antiretrovirali attualmente in uso

Classe di farmaci	Nome dei farmaci
NRTI	Abacavir, Didanosina, Emetricitabina, Lamivudina, Tenofovir (difumarato o alafenamide), Stavudina, Zidovudina
NNRTI	Etravirina, Efavirenz, Nevirapina, Rilpivirina, Doravirina
PI	Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Lopinavir, Saquinavir, Tipranavir,
EI	Enfuvirtide, Maraviroc
INSTI	Raltegravir, Elvitegravir, Dolutegravir, Bictegravir, Cabotegravir
Booster	Ritonavir, Cobicistat

NRTI, inibitori nucleosidici/ nucleotidici della trascrittasi inversa; NNRTI, inibitori non nucleosidici/ nucleotidici della trascrittasi inversa; PI, inibitori della proteasi; EI, inibitori della fusione; INSTI, inibitori dell'integrasi.

Resistenza

Il virus dell'HIV si riproduce molto velocemente, generando miliardi di nuovi virus ogni giorno. Spesso si verificano degli errori nel processo di riproduzione e le nuove generazioni di virus sono leggermente differenti dalle vecchie; alcune di queste variazioni aumentano la capacità del virus di riprodursi pur in presenza del farmaco nell'organismo. La resistenza al farmaco o alla classe di farmaci che compongono il trattamento del paziente HIV+, comporta il fallimento terapeutico, definito come un numero di copie/mL di HIV-RNA plasmatico >50, 6 mesi dopo l'inizio della terapia. La resistenza è spesso causata dal fatto che il paziente non assume i farmaci con continuità o che le concentrazioni plasmatiche non raggiungono i livelli minimi di efficacia a causa di altre variabili (2).

IL THERAPEUTIC DRUG MONITORING DEI FARMACI ANTIRETROVIRALI

La marcata variabilità interindividuale nella capacità di assorbire, distribuire, metabolizzare e/o eliminare i farmaci comporta variazioni farmacocinetiche da paziente a paziente che rendono differenti le risposte alla stessa dose di farmaco. A determinare tale variabilità concorrono fattori di natura diversa quali, fattori fisiologici (età, sesso), patologici (malattie epatiche e renali, procedure dialitiche), ambientali (interazioni tra farmaci) e genetici (variabilità interindividuale nell'attività degli enzimi responsabili del metabolismo di alcuni farmaci).

Il Therapeutic Drug Monitoring (TDM) è una strategia che consente attraverso la determinazione plasmatica delle concentrazioni dei farmaci, di massimizzare l'efficacia del trattamento minimizzando la sua tossicità. L'uso del TDM come strumento clinico nella gestione della terapia antiretrovirale è sottolineato in diverse linee guida internazionali e nazionali (DHHS, BHIVA, SIMIT) con alcune differenze relative al livello delle raccomandazioni.

Il TDM degli antiretrovirali non è una procedura da eseguire di routine in tutti i pazienti; vi sono, tuttavia, numerose circostanze in cui il suo utilizzo può permettere di identificare pazienti con esposizione non ottimale alla terapia e di instaurare regimi posologici personalizzati al fine di migliorare l'outcome clinico (9-12).

Applicazioni cliniche del TDM degli antiretrovirali

I possibili scenari clinico-terapeutici di applicazione del TDM degli antiretrovirali nella pratica clinica sono elencati qui di seguito (5,9-12):

- in caso di interazioni farmacologiche di potenziale rilevanza clinica. Nel contesto delle interazioni è da sottolineare la raccomandazione di alcune linee guida nell' eseguire il TDM dei farmaci antiretrovirali nei pazienti con co-infezione HIV/tubercolosi;
- in trattamento con rifabutina o rifampicina;
- nei pazienti pediatrici;

- nella valutazione dell'aderenza terapeutica a breve termine;
- in condizioni di alterata funzionalità d'organo (fegato, rene, intestino) potenzialmente interferenti sui processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione;
- nei pazienti con HIV-RNA rilevabile (fallimento virologico) in assenza di mutazioni;
- nell' impiego di regimi e/o dosaggi non standardizzati;
- nella tossicità correlata alle concentrazioni del farmaco;
- in gravidanza.

Classi di farmaci ed applicabilità del TDM

Più specificatamente, è possibile individuare le principali applicazioni del TDM nelle differenti classi di farmaci antiretrovirali e stabilirne l'utilità.

Nucleotide/Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI)

Il TDM non è attualmente considerato di utilità clinica in quanto le concentrazioni plasmatiche degli NRTI non risultano correlabili alle concentrazioni intracellulari di farmaco attivo. Vi sono alcune evidenze di una possibile associazione tra livelli plasmatici di tenofovir (pazienti in trattamento con tenofovir disoproxil fumarato, TDF) e presenza di alterazione della funzionalità renale; allo stato attuale solo per questa associazione si configura una ricaduta diretta nella pratica clinica. È da sottolineare che la disponibilità della nuova formulazione tenofovir alafenamide fumarato (TAF) ha semplificato la gestione terapeutica riducendo l'incidenza di tossicità renale. Al momento non sono state identificate concentrazioni plasmatiche soglia associate ad un aumento di tossicità renale per TAF.

Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI), Protease Inhibitor (PI) e Integrase Strand Transfer Inhibitor (INSTI)

Il TDM di queste classi può rappresentare elementi di utilità clinica. Le concentrazioni plasmatiche di tali composti si ritiene, infatti, che siano in uno stato di sostanziale equilibrio con le concentrazioni presenti all'interno della cellula, che ricordiamo essere il sito di attività di tutte queste molecole. Ne consegue che la misurazione nel plasma dovrebbe rappresentare un buon surrogato della concentrazione intra-cellulare, pur tenendo conto del fatto che l'equilibrio relativo tra i due ambienti farmacocinetici varia molto in termini quantitativi da un composto all'altro.

In un parallelo con la farmacodinamica degli antibiotici, i farmaci NNRTI, PI e INSTI riconoscono un meccanismo prevalentemente di tempo-dipendenza. Ciò sta a significare che per tutta la durata dell'intervallo di tempo fra le somministrazioni, le concentrazioni plasmatiche di farmaco devono essere superiori alla minima concentrazione inibente l'attività del virus [concentrazione inibente 50%, (IC50) o concentrazione inibente 90%, (IC90)].

Da questo emerge l'importanza della determinazione della concentrazione di valle (Ctrough) del farmaco, ritenuta comunemente la concentrazione plasmatica minima del composto stesso, pur se tale identificazione non è sempre reale da un punto di vista squisitamente farmacocinetico. Per inciso, Efavirenz rappresenta l'unico farmaco per il quale non si utilizza la Ctrough come parametro di valutazione, bensì il valore di concentrazione dopo 12-14 ore dall'assunzione, considerando la preferibile mono-somministrazione dello stesso nelle ore serali al fine di minimizzare la comparsa di tossicità neurologica.

Al fine di perseguire l'efficacia terapeutica, le concentrazioni degli antiretrovirali dovranno rimanere per l'intera durata del tempo che intercorre fra le assunzioni della terapia, al di sopra di valori minimi terapeutici che permettano l'inibizione della replicazione virale e al di sotto di valori di concentrazioni che possono essere associate a forme di tossicità. Fra i diversi parametri farmacocinetici, prevale al momento la considerazione della concentrazione minima misurata nell'intervallo di tempo fra le somministrazioni, quale valore informativo della potenziale efficacia del farmaco. In riferimento ai valori minimi utili per l'inibizione della replicazione virale e ai valori massimi correlati a tossicità, si osserva che questi non sono stati ancora definiti per la stragrande maggioranza dei farmaci antiretrovirali (9-12).

Metodiche analitiche per il TDM degli antiretrovirali

L'applicazione del TDM richiede la disponibilità di tecniche riproducibili, specifiche e sensibili. I metodi per la determinazione degli antiretrovirali necessitano di aggiornamenti continui, in quanto nuovi farmaci vengono costantemente approvati e introdotti nel regime cART. La cromatografia liquida accoppiata a rivelatori come ultravioletto (UV), fluorescenza e spettrofotometria di massa (MS) è la metodica di prima scelta nella maggior parte dei laboratori di farmacologia clinica. In alternativa, sono disponibili saggi immunologici.

Cromatografia liquida

I sistemi di cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC) sono costituiti da una fase mobile (solvente) che fluisce attraverso una fase stazionaria (colonna) ad alta pressione. La separazione cromatografica può essere per: affinità, scambio ionico, fase normale, fase inversa. Alla fine della colonna è applicato un rivelatore (fluorimetro, UV o MS) e un calcolatore, che permettono una analisi in continuo e l'identificazione e la quantificazione di più molecole presenti nel campione iniettato.

Precedentemente alla fase strumentale, il farmaco presente nel plasma deve essere estratto dalla matrice. Ci sono diverse tecniche di estrazione che sono utilizzate per eliminare la maggior parte delle sostanze che

potrebbero interferire con l'analisi cromatografica, ad esempio: liquido/liquido, a fase solida e per precipitazione di proteine.

Le metodiche HPLC-UV e HPLC-MS sono le più utilizzate e affidabili per la determinazione degli antiretrovirali. I vantaggi di questi metodi analitici sono l'elevata sensibilità, specificità, l'ampio spettro d'applicazione, la contemporanea determinazione di diversi farmaci in una singola misurazione e la possibilità di sviluppo di analisi veloci, affidabili e altamente flessibili (13).

Saggi immunologici

La maggior parte delle tecniche di immunodosaggio sono metodiche semplici e rapide. La quantità di campione da analizzare è molto piccola e non necessita di alcun trattamento preventivo. In questi saggi, il farmaco viene identificato dalla sua complessazione con un anticorpo e con una molecola per la rilevazione come un radioisotopo (14) o più comunemente un enzima (15).

INDICAZIONI

Premessa

La presente raccomandazione è intesa a fornire informazioni sul TDM dei farmaci antiretrovirali e a produrre una tabella contenente i valori degli intervalli terapeutici aggiornati e validati per la gestione clinica dei pazienti HIV+. La base delle indicazioni è costituita da una linea guida italiana già esistente contenente gli intervalli terapeutici per i farmaci antiretrovirali (SIMIT 2017) (5); tali valori sono stati poi integrati in base all'analisi dei riferimenti bibliografici individuati per ogni singolo farmaco (fonti: Pubmed, Google Scholar e data sheet da fonti commerciali).

All'interno di tale analisi, sono stati tenuti in debito conto la popolazione oggetto dello studio, i metodi analitici utilizzati e la numerosità del campione.

La ricerca bibliografica ha in particolare riguardato gli intervalli terapeutici per il TDM degli antiretrovirali contenuti in linee guida esistenti per il trattamento dell'infezione da HIV a livello nazionale ed internazionale, nonché l'utilizzo di fonti bibliografiche (compresi i casi clinici) che riportassero valori di concentrazione al di sotto dei quali le possibilità di sviluppo di resistenze virali aumentano (valore minimo) e valori di tossicità al di sopra dei quali il trattamento in corso poteva produrre effetti indesiderati (valore massimo).

Risultati

Nella Figura 1 è presentato il diagramma di flusso per l'identificazione dei farmaci antiretrovirali¹ da sottoporre a revisione sistematica degli intervalli terapeutici.

¹ L'intervallo di riferimento (da non confondere con l'intervallo terapeutico) è un indice della distribuzione attesa delle concentrazioni di un farmaco. Viene spesso derivato dagli studi di farmacocinetica pubblicati o da dati "real life" (cioè raccolti nella pratica quotidiana). In sostanza, indica se il farmaco somministrato ad una determinata dose in un paziente ha un'esposizione confrontabile o meno a quella misurata nella popolazione generale. Non vi è però dimostrazione alcuna che i pazienti che risultino fuori dall'intervallo abbiano una risposta peggiore

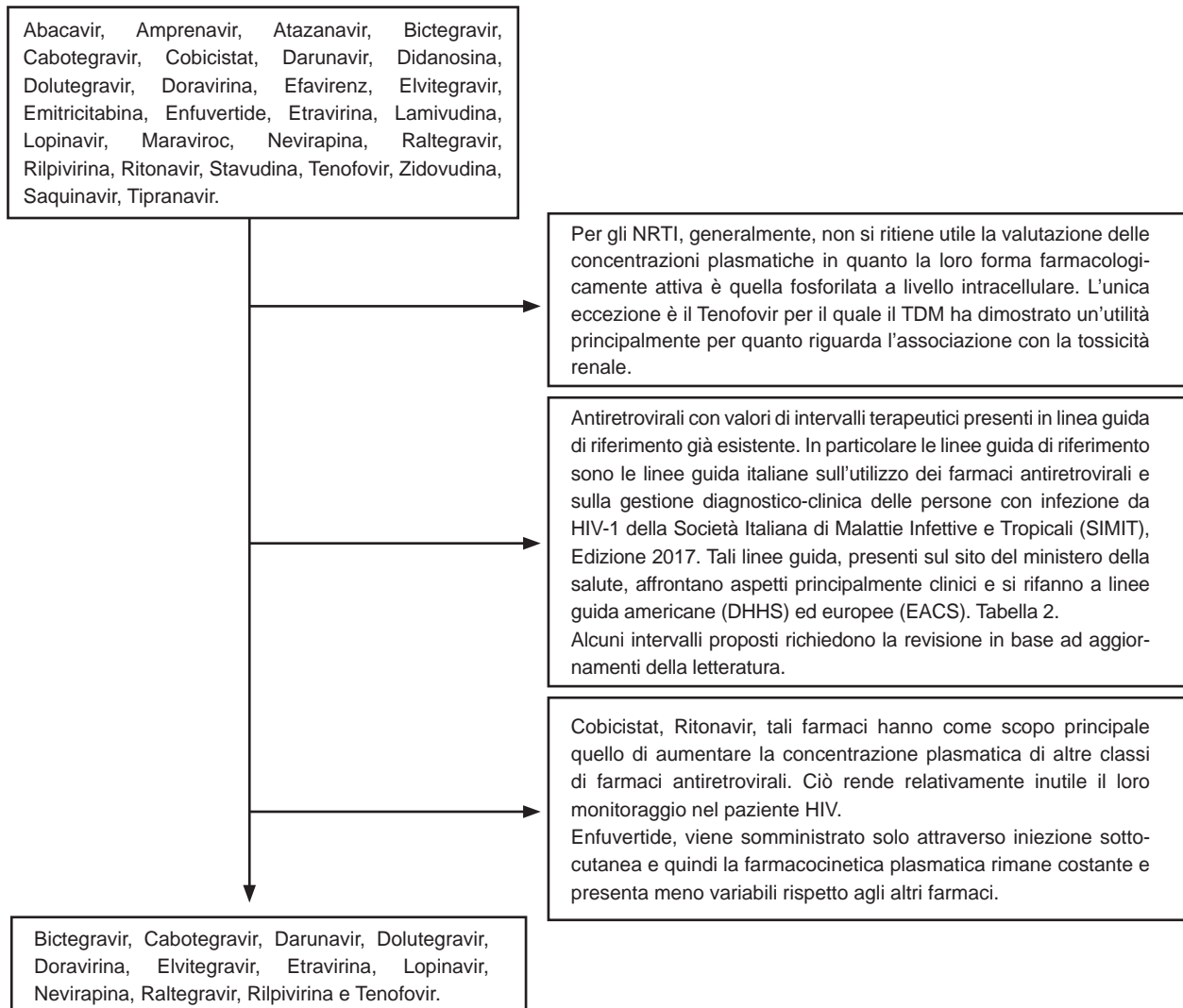


Figura 1

Diagramma di flusso utilizzato per l'identificazione dei farmaci antiretrovirali da sottoporre a revisione bibliografica degli intervalli terapeutici. Per i farmaci nei riquadri di destra, non è stato necessario individuare nuovi intervalli terapeutici; mentre per i farmaci inclusi nel riquadro finale, si è ritenuto necessario eseguire una revisione bibliografica

L'intervallo terapeutico nel monitoraggio plasmatico dei farmaci antiretrovirali esprime le concentrazioni entro le quali un paziente ha la probabilità maggiore di avere una risposta farmacologica:

- ottimale (se le concentrazioni plasmatiche sono all'interno dell'intervallo terapeutico);
- inefficacie (se le concentrazioni plasmatiche sono inferiori all'intervallo terapeutico);
- tossica (se le concentrazioni plasmatiche sono superiori all'intervallo terapeutico).

L'identificazione di un corretto intervallo terapeutico presuppone che vi siano studi che abbiano documentato tali relazioni. Per esempio, per Efavirenz l'intervallo 1000-4000 ng/mL è terapeutico perchè vi sono studi che hanno dimostrato che i pazienti con concentrazioni di Efavirenz <1000 ng/mL hanno un rischio maggiore di fallimento virologico e pazienti con concentrazioni maggiori di 4000 ng/mL presentano un rischio maggiore

di tossicità per il sistema nervoso centrale, mentre all'interno di queste concentrazioni si ha una efficacia ottimale del trattamento con un rischio minimo di tossicità.

Intervalli ricavati da linee guida esistenti e rivisti dal gruppo di studio

Dalle linee guida italiane SIMIT del 2017 (5) sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1 sono stati ricavati i valori degli intervalli terapeutici di diversi farmaci antiretrovirali (Amprenavir, Atazanavir, Efavirenz, Indinavir, Lopinavir, Maraviroc, Nevirapina, Ritonavir, Saquinavir e Tipranavir) ed inseriti in (Tabella 2). Le linee guida SIMIT, sono presenti sul sito del Ministero della Salute, affrontano aspetti principalmente clinici e si rifanno a linee guida americane (DHHS) ed europee (EACS) (4,6-7).

Tabella 2*Intervalli terapeutici suggeriti dei farmaci antiretrovirali (Gruppo di Studio "TDM e Personalizzazione della Terapia")*

Farmaco	Valore minimo (ng/mL)	Valore massimo (ng/mL)	Riferimento
Amprenavir	400		5
Atazanavir	150	850	5
Bictegravir	162 (concentrazione ottenuta da IC95)		24-26
Cabotegravir	166 (concentrazione ottenuta da IC90)		27
Darunavir	550	7 242	23,28-31
Dolutegravir	300	2 138	23,32-34
Doravirina	33,2 (concentrazione ottenuta da IC50)		35-37
Efavirenz	1 000	4 000	5
Elvitegravir	45	2 400	23,38-41
Etravirina	160 naive 300 experienced	3 000	42-45
Indinavir	100	500	5
Lopinavir	1 000	8 000	5,16,17
Maraviroc	50		5
Nevirapina	3 000	6 000	5,18-20
Raltegravir	40		23,46,47
Rilpivirina	12 naive 50 experienced	500	48-50
Saquinavir	100-250		5
Tenofovir (per Tenofovir DiproxilFumarato)	40	180	51-55
Tenofovir (per Tenofovir AlaFenamida)	9,8-20,4		23
Tipranavir	20 500		5

IC95, concentrazione inibente 95% del virus HIV in vitro; IC90, concentrazione inibente 90% del virus HIV in vitro; IC50, concentrazione inibente 50% del virus del virus HIV in vitro.

La maggior parte dei valori riportati dalle linee guida SIMIT sono stati ritenuti validi dal Gruppo, fatta eccezione per il Lopinavir e la Nevirapina. Per questi due farmaci antiretrovirali, dopo un'attenta valutazione degli intervalli terapeutici descritti, si è ritenuto necessario aggiornare ed integrare i dati con fonti bibliografiche diverse (16-20).

Intervalli terapeutici ricavati da revisione della letteratura

La revisione bibliografica degli studi di farmacocinetica nei quali vengono definiti dei livelli minimi e massimi delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci antiretrovirali sono riportati nella Tabella 2.

I dati riportati in tabella fanno riferimento alle concentrazioni di valle (C_{trough}), quindi al prelievo dopo 12 ore per i farmaci con assunzione due volte al giorno (BID) e dopo 24 ore per i farmaci a singola somministrazione giornaliera (QID).

Unica eccezione per l'Efavirenz per il quale i valori si riferiscono al prelievo dopo 12-14 ore dall'assunzione anche se è un farmaco QID (21).

All'interno delle referenze, le voci bibliografiche sono divise per singolo farmaco in modo da risalire agli articoli di riferimento in maniera più intuitiva.

Per i farmaci più recenti (Bictegravir, Cabotegravir e Doravirina), per i quali gli studi sono ancora in corso

o non completamente esaustivi, si è scelto di fare riferimento alle concentrazioni inibenti il virus HIV derivate da esperimenti *in vitro* (cioè su cellule o tessuti e non in pazienti) e successivamente aggiustate per la quota di legame alle proteine.

Per quanto riguarda il Tenofovir, sono stati riportati i valori associati all'assunzione del TDF o del TAF (due formulazioni diverse dello stesso farmaco). Questa differenziazione è dovuta alla valutazione di studi farmacocinetici che hanno dimostrato che la somministrazione di TAF, rispetto a TDF, determina una riduzione del 90% delle concentrazioni plasmatiche di Tenofovir, mentre l'esposizione intracellulare alla molecola farmacologicamente attiva (tenofovir-trifosfato) risulta aumentata (22). Quindi, le concentrazioni plasmatiche di riferimento di Tenofovir, individuate per i pazienti che assumono TDF, non possono essere applicate ai pazienti che assumono TAF. Attualmente, non sono disponibili intervalli terapeutici di Tenofovir per questa nuova formulazione; nella Tabella 2 vengono però mostrate le concentrazioni minime osservate in un studio su 500 soggetti HIV+ trattati con TAF (23).

Nella Tabella 2 sono riassunti tutti gli intervalli terapeutici dei farmaci antiretrovirali derivati dalle precedenti linee guida e dalla revisione della bibliografia.

CONCLUSIONI

Le informazioni riportate in queste indicazioni potranno essere utili a tutti i professionisti che si occupano di TDM dei farmaci antiretrovirali (clinici, laboratoristi, farmacologi clinici). Lo scopo di questo documento è stato quello di armonizzare gli intervalli terapeutici delle concentrazioni plasmatiche dei singoli farmaci anti-HIV che in molti contesti non erano ben definiti o da aggiornare. Aumentando le conoscenze sull'utilizzo del TDM degli antiretrovirali è possibile valutare preventivamente l'efficacia al trattamento e ridurre al minimo il rischio di tossicità, rendendo personalizzata la gestione terapeutica del paziente HIV+.

Definire gli intervalli di molti farmaci antiretrovirali richiederà continui aggiornamenti utilizzando futuri studi di farmacocinetica con popolazioni di dimensioni maggiori dove vi è un'elevata variabilità inter-paziente.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Moore RD, Chaisson RE. Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 1999;13:1933-42.
- Richman, D. HIV chemotherapy. *Nature* 2001;410:995-1001.
- <https://www.cdc.gov/hiv/clinicians/guidelines/> (ultimo accesso: marzo 2022).
- <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/whats-new-guidelines> (ultimo accesso: marzo 2022).
- HIV/AIDS Italian Expert Panel. (2017). Linee Guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2696_allegato.pdf. (ultimo accesso: marzo 2022).
- European AIDS Clinical Society. Guidelines Version 10.1 - October 2020 Available from <http://www.eacsociety.org>. (ultimo accesso: marzo 2022).
- British HIV Association guidelines. <https://www.bhiva.org/guidelines>. (ultimo accesso: marzo 2022).
- Montessori V, Press N, Harris M, et al. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ* 2004;170:229-38.
- Punyawudho B, Singkham N, Thammajaruk N, et al. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in HIV-infected patients. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016;9:1583-95.
- Pretorius E, Klinker H, Rosenkranz B. The role of therapeutic drug monitoring in the management of patients with human immunodeficiency virus infection. *Ther Drug Monit* 2011;33:265-74.
- Calcagno A, Pagani N, Ariaudo A, et al. Therapeutic drug monitoring of boosted PIs in HIV positive patients: undetectable plasma concentrations and risk of virological failure. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1741-4.
- Marzinke, M. A. Therapeutic drug monitoring of antiretrovirals. In: Clarke W, ed. *Clinical challenges in therapeutic drug monitoring: special populations, physiological conditions, and pharmacogenomics*. London: Elsevier Science Publisher, 2016:135-63.
- Charbe, Nitin B., et al. Bio-analytical assay methods used in therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs-A review. *Current Drug Therapy* 2019;14:16-57
- Robbins BL, Tran TT, Pinkerton FH, et al. Development of a new cartridge radioimmunoassay for determination of intracellular levels of lamivudine triphosphate in the peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2656-60.
- Abdissa A, Wiesner L, McIlleron H, et al. Evaluation of an immunoassay for determination of plasma efavirenz concentrations in resource-limited settings. *J Int AIDS Soc* 2014;17:18979.
- Gutiérrez F, Padilla S, Navarro A, et al. Lopinavir plasma concentrations and changes in lipid levels during salvage therapy with lopinavir/ritonavir-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:594-600.
- Gutiérrez F, Padilla S, Masiá M, et al. Changes in body fat composition after 1 year of salvage therapy with lopinavir/ritonavir-containing regimens and its relationship with lopinavir plasma concentrations. *Antivir Ther* 2004;9:105-13.
- de Vries-Sluijs TE, Dieleman JP, Arts D, et al. Low nevirapine plasma concentrations predict virological failure in an unselected HIV-1-infected population. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:599-605.
- Duong M, Buisson M, Peytavin G, et al. Low trough plasma concentrations of nevirapine associated with virologic rebounds in HIV-infected patients who switched from protease inhibitors. *Ann Pharmacother* 2005;39:603-9.
- Gonzalez de Requena D, Nunez M, Jimenez-Nacher I, Soriano V. Liver toxicity caused by nevirapine. *AIDS* 2002;16:290-1.
- Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, et al. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001;15:71-5.
- Podany AT, Bares SH, Havens J, et al. Plasma and intracellular pharmacokinetics of tenofovir in patients switched from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide. *AIDS (London, England)* 2018;32:761-5.

23. Cattaneo D, Baldelli S, Cozzi V, et al. Impact of therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in routine clinical management of people living with HIV a narrative review. *Ther Drug Monit.* 2020;42:64-74.
24. EMA, Assessment report Biktarvy 2018: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/biktarvy-epar-public-assessment-report_en.pdf (ultimo accesso: marzo 2022).
25. Gallant JE, Thompson M, DeJesus E, et al. Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics of bictegravir as 10-day monotherapy in HIV-1-infected adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017;75:61-6.
26. Sax PE, Pozniak A, Montes ML, et al. Coformulated bictegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide versus dolutegravir with emtricitabine and tenofovir alafenamide, for initial treatment of HIV-1 infection (GS-US-380-1490): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* 2017;390:2073-82.
27. Swindells S, Lutz T, van Zyl L, et al. Long-acting cabotegravir + rilpivirine for HIV-1 treatment: ATLAS week 96 results. *AIDS* 2021;13.
28. Alicia GV, Maria TR, Tamara FM, et al. Darunavir/cobicistat showing similar effectiveness as darunavir/ritonavir monotherapy despite lower trough concentrations. *J Int AIDS Soc* 2018;21:e25072.
29. Daskapan A, Tran QTD, Cattaneo D, et al. Darunavir population pharmacokinetic model based on HIV outpatient data. *Ther Drug Monit* 2019;41:59-65.
30. Jennifer R K, Amit K, Roger et al. Pharmacokinetic evaluation of darunavir administered once or twice daily in combination with ritonavir or the three-direct-acting antiviral regimen of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir and dasabuvir in adults coinfecting with Hepatitis C and Human Immunodeficiency Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e02135-16.
31. Boffito M, Jackson A, Amara A, et al. Pharmacokinetics of once-daily Darunavir-Ritonavir and Atazanavir-Ritonavir over 72 hours following drug cessation. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4218-23.
32. Min S, Song I, Borland J, et al. Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) relationship of S/GSK1349572, a next generation integrase inhibitor (INI), in HIV-1 infected patients. 5th Conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention; July 19-22, 2009 International AIDS Society, Cape Town, South Africa (2009).
33. Ruel T D, Acosta E, Liu JP, et al. Pharmacokinetics, safety, tolerability, and antiviral activity of dolutegravir dispersible tablets in infants and children with HIV-1 (IMPAACT P1093): results of an open-label, phase 1-2 trial. *Lancet HIV* 2022;5:e332-40.
34. Borghetti, A. Calcagno, F. Lombardi, et al. SLC22A2 variants and dolutegravir levels correlate with psychiatric symptoms in persons with HIV. *J Antimicrob Chemother* 2019;74: 1035-43.
35. Xu Y, Li YF, Zhang D, et al. Characterizing class-specific exposure-viral load suppression response of HIV antiretrovirals using a model-based meta-analysis. *Clin Transl Sci* 2016;9:192-200.
36. Lai MT, Feng M, Falgoutyret JP, et al. In vitro characterization of MK-1439, a novel HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1652-63.
37. Khalilieh S, Yee, KL, Sanchez R, et al. Clinical pharmacokinetics of the novel HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor doravirine: an assessment of the effect of patient characteristics and drug-drug interactions. *Clin Drug Investig* 2020;40:927-46.
38. Harris M, Ganase B, Watson B, et al. HIV treatment simplification to elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir disproxil fumarate (E/C/F/TDF) plus darunavir: a pharmacokinetic study. *AIDS Res Ther* 2017;14:59.
39. Momper JD, Best BM, Wang J, et al. Elvitegravir/cobicistat pharmacokinetics in pregnant and postpartum women with HIV. *AIDS* 2018;32:2507-16.
40. Rimawi BH, Johnson E, Rajakumar A, et al. Pharmacokinetics and Placental Transfer of Elvitegravir, Dolutegravir, and Other Antiretrovirals during Pregnancy Antimicrob Agents Chemother 2017;61:e02213-16.
41. Ramanathan S, Mathia A, German P et al. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of the HIV integrase inhibitor elvitegravir. *Clin Pharmacokinet* 2011;50:229-44.
42. Kakuda T, Sekar V, Vis P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darunavir and etravirine in HIV-1-Infected, treatment-experienced patients in the gender, race, and clinical experience (grace) trial. *AIDS Res Treat* 2012;186987.
43. Landry S, Chen CN, Patel N, et al. Therapeutic drug monitoring in treatment-experienced HIV-infected patients receiving darunavir-based salvage regimens: A case series. *Antiviral Res* 2018;152:111-6.
44. Di Perri G, Green B, Morrish G, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of etravirine 400 mg once daily in treatment-naïve patients. *HIV Clin Trials* 2013;14:92-8.
45. Calcagno A, Marinaro L, Nozza S, et al. Etravirine plasma exposure is associated with virological efficacy in treatment-experienced HIV-positive patients. *Antiviral Res* 2014;108:44-7.
46. Martínez-Rebollar M, Muñoz A, Pérez I, et al. Pharmacokinetic study of dual therapy with raltegravir 400 mg twice daily and Darunavir/Ritonavir 800/100 mg once daily in HIV-1-infected patients. *Ther Drug Monit* 2013;35:552-6.
47. Ananworanich J, Gorowara M, Avihingsanon A, et al. Pharmacokinetics of and short-term virologic response to low-dose 400-milligram once-daily raltegravir maintenance therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1892-8
48. Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, et al. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:718-27.
49. Aouri M, Barcelo C, Guidi M, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics analysis of rilpivirine in hiv-1-infected individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 61: e00899-16.
50. U.S. Food and Drug Administration. 2011. Edurant. NDA 202-022/N-000 for TMC278 (rilpivirine) http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202022Orig1s000ClinPharmR.pdf. (ultimo accesso: marzo 2022).
51. Ezinga M, Wetzels JF, Bosch ME, et al. Long-term treatment with tenofovir: prevalence of kidney tubular dysfunction and its association with tenofovir plasma concentration. *Antivir Ther* 2014;19:765-1.
52. Rodriguez-Novoa S, Labarga P, D'Avolio A, et al. Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS* 2010;24:1064-6.
53. Gervasoni C, Meraviglia P, Landonio S, et al. Low body weight in females is a risk factor for increased tenofovir exposure and drug-related adverse events. *PLoS One* 2013;8:e80242.
54. Poizot-Martin I, Solas C, Allemand J, et al. Renal impairment in patients receiving a tenofovir-cART regimen: impact of tenofovir trough concentration. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;62:375-80.
55. Cattaneo D, Baldelli S, Castoldi S, et al. Is it time to revise antiretrovirals dosing? a pharmacokinetic viewpoint. *AIDS* 2014;28:2477-80.

Evaluation of the cardiovascular risk in patients undergoing major non-cardiac surgery: role of cardiac-specific biomarkers

Consensus document by the Inter-Society Study Group on Cardiac Biomarkers of the Italian Societies of Clinical Biochemistry: European Ligand Assay Society (ELAS), Italian section; Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC); Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL)

Aldo Clerico¹, Martina Zaninotto², Alberto Aimò¹, Veronica Musetti¹, Marco Perrone³, Andrea Padoan⁴, Ruggero Dittadi⁵, Maria Teresa Sandri⁶, Sergio Bernardini³, Laura Sciacovelli², Tommaso Trenti⁷, Lucia Malloggi⁸, Marco Moretti⁹, Maria Aurora Burgio¹⁰, Massimiliano Luca Manno¹¹, Mario Plebani⁴

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

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

² Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, e Dipartimento di Medicina, Università di Padova

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma Tor Vergata, Roma

⁴ Dipartimento di Medicina di Laboratorio-DIMED, Università di Padova

⁴ Ospedale dell'Angelo, Mestre

⁵ Laboratorio Bianalisi, Carate Brianza (MB)

⁶ Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria e USL di Modena

⁷ Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Pisa

⁸ Medicina di Laboratorio, AOU Ospedali Riuniti Ancona

⁹ Patologia Clinica P.O. Barone Lombardo, Canicattì, Agrigento

¹⁰ U.O. Patologia Clinica, P.O. Santa Maria Novella, Galatina, Lecce

ABSTRACT

Cardiovascular risk evaluation in patients undergoing major non-cardiac surgery: role of cardiac-specific biomarkers.

Joint document of the Italian Societies of Clinical Biochemistry: European Ligand Assay Society, Sezione Italiana (ELAS), Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC), Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL)

Patients undergoing major surgery have a substantial risk of cardiovascular events during the perioperative period. Despite the introduction of several risk scores based on medical history, classical risk factors and non-invasive cardiac tests, the possibility to predict cardiovascular events in patients undergoing non-cardiac surgery remains limited. The cardiac-specific biomarkers natriuretic peptides (NPs) and cardiac troponins (cTn) have been proposed as additional tools for risk prediction in the peri-operative period. This Consensus Document aims to discuss the value of preoperative levels and perioperative changes in cardiac-specific biomarkers to predict adverse outcomes in patients undergoing major non-cardiac surgery. Based on several prospective observational studies and 6 meta-analyses, some guidelines recommended the measurement of NPs to refine perioperative cardiac risk estimation in patients undergoing non-cardiac surgery. More recently, several studies reported a higher mortality in surgical patients presenting an elevation in high-sensitivity cTnT and cTnI, especially in elderly patients or those with comorbidities. This evidence should be considered in future international guidelines on the evaluation of perioperative risk in patients undergoing major non-cardiac surgery.

This Document is jointly published by the Journal and/or the web sites of the Scientific Societies that contributed to its issuing

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, E-mail aldoclerico1948@gmail.com

Ricevuto: 29.03.2022

Accettato: 04.04.2022

Publicato on-line: 18.05.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.021

INTRODUCTION

Patients undergoing major non-cardiac surgery have a substantial risk of major adverse cardiovascular events during the peri-operative period (1-7). These events still represent a significant concern in patients undergoing non-cardiac surgery, despite a decreasing incidence over the last 30 years (8-11). Every year about 16 700 cardiac complications of non-cardiac surgery are reported, and 19000 of them are life-threatening events (8). The 2014 European Society of Cardiology/European Society of Anaesthesiology (ESC/ESA) Guidelines recommended to perform a careful risk assessment of cardiac events also in patients undergoing non-cardiac surgery (8). Unfortunately, the possibility to predict cardiovascular events remains limited, despite the introduction of several algorithms to calculate the risk of adverse events, mainly death and major adverse cardiovascular events (MACE) based on the clinical history, risk factors (sex, age, lipid profile, serum creatinine) and non-invasive cardiac exams (electrocardiogram, echocardiogram, stress tests) (4,5,8,9). For this reason, cardiac-specific biomarkers have been proposed as additive tools to predict the risk of cardiovascular events (3,10-12).

The Canadian Cardiovascular Society (CCS) Guidelines published in 2017 recommended the measurement of cardiac natriuretic peptides [NPs; B-type NP (BNP)] or the N-terminal fragment of pro-BNP (NT-proBNP) before surgery to refine the prediction of cardiac events during the peri-operative period (13). These recommendations relied on prospective observational studies and 6 meta-analyses that evaluated the accuracy of NPs to predict major adverse cardiovascular events after non-cardiac surgery (14-21).

Over the last 10 years, increased concentrations of cardiac troponin (cTn) have been associated with a higher risk of cardiac events in the short- and long-term in patients undergoing non-cardiac surgery (10-13, 22-45). Nonetheless, at present there are no specific recommendations on the measurement of cTn during the peri-operative period.

This inter-society expert document aims to analyse in detail the clinical value of biomarkers measured before surgery and changes in biomarker levels during the peri-operative period, as well as their role, which is essential to predict the adverse events in patients undergoing major non-cardiac surgery. Building on published evidence we have formulated recommendations for the evaluation of patients at highest risk of MACE during non-cardiac surgery. This Consensus Document has been written by the Inter-Society Study Group on Cardiac Biomarkers of the Italian Societies of Clinical Biochemistry, and has been endorsed by the boards of the following Societies: European Ligand Assay Society (ELAS), Italian section; Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC); Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL).

EVALUATION OF THE CARDIOVASCULAR RISK THROUGH THE USE OF CARDIAC BIOMARKERS IN PATIENTS UNDERGOING NON-CARDIAC SURGERY

Around half of cardiac deaths during the peri-operative period occurs in patients without a history of cardiac disease (7,10). This suggests that our current protocols for the assessment of subclinical cardiac disease are still suboptimal (10). The risk prediction models based only on clinical criteria, including the classical risk factors and cardiac stress tests, do not seem to improve the accuracy of pre-operative risk stratification and reduce 30-day mortality after non-cardiac surgery (9,11,12). Most notably, a 2019 meta-analysis included 6 studies on the accuracy of cardiac stress test to predict 30-day mortality, and concluded that there is insufficient evidence that stress testing leads to a reduction in peri-operative mortality (11).

Measurement of BNP and NT-proBNP has been widely accepted as a tool to refine risk stratification and improve prognostic accuracy in patients undergoing non-cardiac surgery, particularly as these biomarkers allow to identify a subclinical cardiac dysfunction (46,47). Furthermore, the measurement of cTnT and I with high-sensitivity (hs) assays has been recommended for identification of myocardial damage (43-45,48-50).

Cardiac NPs are hormones produced and secreted to a greater extent by the heart compared to other organs (43,46,51). International Guidelines recommend the measurement of BNP/NT-proBNP for diagnosis, risk stratification and monitoring of patients with acute and chronic heart failure (47,54). 2014 ESC/ESA Guidelines stated that NP measurement before surgery should not be performed in all patients who must undergo major non-cardiac surgery, but can be considered in all high-risk patients (8). Recently, prospective observational studies and 6 meta-analyses have reassessed the prognostic accuracy of BNP and NT-proBNP for the prediction of cardiovascular events after non-cardiac surgery (14-21). Based on these results, 2017 CCS Guidelines provided recommendations for peri-operative risk assessment before non-cardiac surgery (13). This document strongly recommends the measurement of BNP or NT-proBNP before surgery (including non-cardiac surgery) to improve the prediction of peri-operative MACE in patients with the following characteristics: age >65 years, age 45-64 years but known cardiovascular disease, a Revised Cardiac Risk Index (RCRI) score >1 (13). The RCRI algorithm includes: ischemic cardiac disease, heart failure, cerebrovascular disease, diabetes mellitus, serum creatinine >177 $\mu\text{mol/L}$ or 2.0 mg/dL, and high-risk major surgery (intra-peritoneal, vascular endothoracic or suprainguinal) (13).

2014 ESC/ESA Guidelines stated that cTnI or cTnT measurement can be considered in patients at high risk, before and 48-72 hours after major cardiac surgery, to detect a cardiac damage (8). This recommendation is based on the evidence that peri-operative increases in cTn are associated with a greater risk of cardiac events

in the short- and long-term in patients undergoing non-cardiac surgery, particularly when hs-cTnI and hs-cTnT methods are used (10-13,22-42).

In 2019, Humble et al. performed a systematic review and meta-analysis on the prognostic value of the increase of cTn above a decisional value (usually the 99th percentile upper reference limit) in adult patients undergoing non-cardiac surgery (35). The endpoints were MACE during the hospital stay or within 30 days from discharge or all-cause death. This meta-analysis included 19 studies that evaluated the pre-operative concentration of cTn and 3 studies assessing the peri-operative changes in cTn (35). cTn was measured in a total of 13 386 samples (from 33 to 4 575 across the different studies). The studies were mostly prospective and single-center, and patients underwent different types of non-cardiac interventions, but with an intermediate-to-high risk. Six studies employed hs-cTn methods (35). Pre-operative cTn measurement was able to predict adverse events on the short- [adjusted odds ratio (OR) 5.87, 95% confidence interval (CI) 3.24-10.65, $p < 0.001$] and the long-term (adjusted hazard ratio 2.0, 95% CI 1.4-3.0, $p < 0.001$) (35).

Recently, Lowe et al. evaluated the utility of the peri-operative increase in cTn as a predictor of cardiac morbidity and mortality in patients operated on femoral neck fractures (52,53). These fractures are rare in subjects aged <50 years in the absence of major traumas, while in elderly patients they may occur following minor traumas because of reduced bone density and bone frailty (39,52,53). This meta-analysis included 11 studies with a total of 1 363 patients (mean age 83 years, 351 men and 904 women) (39). In detail, 7 studies assessed cTnI, 3 hs-cTnT and one study assessed hs-cTnI. Overall, 497 patients (36.5%) have displayed an increase in cTn concentration after surgery. The peri-operative increase in troponin was significantly associated with all-cause mortality (OR 2.6, 95% CI 1.4-4.6, $p < 0.001$) and cardiac complications (OR 7.4, 95% CI 3.5-15.8, $p < 0.001$) (39). Higher cTn levels have been associated with pre-existing coronary artery disease, heart failure, hypertension, stroke and prior myocardial infarction (39). These results demonstrate that the peri-operative increase in cTn is significantly associated with an increase in mortality and post-operative cardiac complications in patients operated for femoral neck fractures (39).

TAKE-HOME MESSAGES

- *About one half of deaths for cardiac cause during the peri-operative phase occurs in patients without a history of cardiac disease. Therefore, there is a crucial need to assess more accurately the cardiovascular risk before major non-cardiac surgery.*
- *In 2014, ESC/ESA Guidelines stated that pre-operative measurement of NPs (BNP or NT-proBNP) should not be systematically performed for risk stratification in all patients who must undergo major non-cardiac surgery, but can be considered in patients with a high-risk (8.)*
- *The same Guidelines state that cTnI and cTnT*

measurement may be considered in patients with a high risk, before or 48-72 hours after major surgery, to detect a myocardial damage (8).

- *In 2017 the CCS recommended the measurement of BNP or NT-proBNP before surgery to better estimate the risk of peri-operative MACE in patients with a higher risk because of their clinical history, age (>65 years), or comorbidities.*

ANALYTICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL CONSIDERATIONS ON CARDIAC-SPECIFIC BIOMARKERS

Both NPs and cTn are useful prognostic indicators in patients undergoing major non-cardiac surgery (10-42). Nonetheless, clinicians should interpret measured values based on the analytical performance of the assay methods and the mechanisms of production and release by the heart. In healthy subjects, NPs and cTn are found in the circulation in a range of concentration (from about 3 to 50 ng/L) (43-45) that are 100 to 1 000 times lower than other biomarkers, including C-reactive protein, creatinine, cholesterol, D-dimer, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (43,55-57). Some proteins and circulating peptides can influence directly the binding of NPs and cTn to specific antibodies used by immunometric methods, thus affecting results. As discussed in details elsewhere (43-45,58-60), this interference becomes more relevant when molar concentrations of different substances able to bind the monoclonal antibodies used by the immunometric systems increase compared to cardiac biomarkers. Furthermore, the measurement of cTnI and cTnT with immunometric methods can be influenced by the binding of these two cardiac troponins with troponin C, with some tissue or plasma proteins and also with some heterophile antibodies or autoantibodies, especially when macromolecular complexes are formed (58,59). Therefore, both the accuracy and the clinical interpretation of the measurement of cardiac biomarkers strongly depend on the analytical characteristics and the performance of the methods of determination (43,58-61).

Methods of determination of cardiac natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP)

The determination of cardiac NPs is an essential diagnostic and prognostic tool in patients with cardiac disorders because these biomarkers are released following a stress able to activate the neuro-endocrine-immune system. It is important to specify that the increase in BNP/NT-proBNP by itself does not allow to define the stress mechanisms acting on an individual patient (51,60-62). In particular, variations in circulating levels of NPs are useful to detect cardiac stress in patients with risk factors or asymptomatic cardiovascular disease (51,60-63).

Cardiac NPs are rapidly degraded *in vivo*. The active hormone BNP has a shorter plasma half-life (20-40 minutes) than the inactive peptide NT-proBNP (>60 minutes) (51,60,64). Because of their rapid turnover, BNP

has a greater intra- and inter-individual variability (40-50% and 50-60%, respectively) compared with NT-proBNP (30-40% and 40-50%, respectively) (60,64). A wide variability is associated with large confidence intervals and large differences between serial measurements in a single individual, regardless of changes in the disease state (65).

Clinicians should be informed by biochemical chemistry experts and then consider some critical issues for a correct interpretation of changes in plasma concentrations of BNP/NT-proBNP (43,44,46,51). In particular, values should be interpreted based on sex, age, body mass index, comorbidities and current therapies (43,47,60-62). Furthermore, kidney disease can influence significantly peptide clearance increasing their circulating levels (60,61). Nevertheless, a meta-analysis has demonstrated that NT-proBNP retains a diagnostic utility for acute heart failure even in patients with chronic kidney disease (although with higher cut-offs) and holds prognostic value regardless of renal function (63).

The methods that measure BNP show greater systematic differences between them than methods that measure NT-proBNP (60,66). Because of its greater stability *in vivo* and *in vitro* and a lower difference between assay methods, NT-proBNP is a better indicator of disease and outcome than BNP (60).

From a clinical perspective, it is important to notice that international guidelines recommend decisional values for the diagnosis and risk prediction in patients with heart failure, but not for the risk stratification of patients undergoing major non-cardiac surgery (46,47). The lack of a general consensus on specific threshold values undoubtedly limits the use of BNP/NT-proBNP in clinical practice for the evaluation of the peri-operative risk. Optimal cut-offs have been calculated for MACE prediction, with a large variability in the proposed cut-offs. In 2009, a meta-analysis on 15 studies and 4856 patients reported that NT-proBNP cut-offs were higher than BNP cut-offs (range 201-791 ng/L vs. 35-255 ng/L, respectively) (16). More recently, Rodseth et al. have evaluated the prognostic value of pre-operative BNP for cardiovascular events (defined as cardiovascular deaths and non-fatal myocardial infarction) and all-cause mortality during the first 30 days after vascular surgery in an individual patient data meta-analysis assessing a total of 632 patients. From the receiving operating characteristics curve, the Authors calculated a BNP cut-off of 116 ng/L (sensitivity 66%, specificity 82%) as the value with the better combination of sensitivity and specificity, and then with the greater accuracy for outcome prediction (20). The Authors also proposed a value of 30 ng/L as a rule-out cut-off (sensitivity 95%, specificity 44%) and a value of 372 ng/L as a rule-in cut-off (sensitivity 32%, specificity 95%) (20).

Assay methods for cTnI and cTnT

The assay methods for hs-cTnI and hs-cTnT have been recommended by the latest international guidelines as the golden standard methods to detect a myocardial damage and diagnose myocardial infarction (49,67-70).

The document published in 2018 from the American Association for Clinical Chemistry and the International Federation of Clinical Chemistry (67) establishes the two essential criteria that define the high-sensitivity methods for cTnI and cTnT. The first criterion is that the 99th percentile upper reference value (URL; the 99th percentile of the distribution of values of hs-cTnI or hs-cTnT in a reference population) must be measured with an error (expressed as coefficient of variation) lower than or equal to 10%. The second, more restrictive, criterion involves that hs-cTnI and hs-cTnT methods measure biomarker concentrations with values higher than the limit of detection of the method in at least 50% of individuals in a reference population including at least 300 apparently healthy women and men (67).

The mechanism underlying the presence of detectable levels of hs-cTnI and hs-cTnT in healthy subjects is not well understood (48,71-73). Theoretical considerations and some experiments in animals and in humans suggest that the 99th URL corresponds to the amount of hs-cTn within around 40 mg of myocardial tissue (48,71-73). Cardiac troponins are localized mostly in the sarcomere of cardiomyocytes and bound to myofibrils; while only around 4-9% of cTnI and cTnT are found in the cytosol of cardiomyocytes as unbound proteins (48,71,72). According to these studies, hs-cTn levels in adult subjects who are apparently healthy should be considered as a specific indicator of the physiological turnover of cardiomyocytes (48,71,72). The estimate of URL of hs-cTnI and hs-cTnT assay methods is influenced by the demographical characteristics of the reference population, in particular sex and age distribution, and likely also the ethnic group (58,59,67,74-76). A very important point is that the intra-individual biological variability of these two biomarkers is very low (on average about 9%) (77). Furthermore, the hs-cTnI and hs-cTnT methods have an excellent analytical imprecision (coefficient of variability 5-7%) at the 99th percentile URL (58,77). Because of these favorable characteristics, the critical differences (reference change value, RCV) between two values of hs-cTnI or hs-cTnT measured in the same subject in different times are inferior than other cardiac biomarkers. According to some recent studies, a RCV >30% can be considered as statistically significant for all hs-cTnI and hs-cTnT methods (77-83). Therefore, hs-cTnI and hs-cTnT are better suited to act as prognostic biomarkers than BNP and NT-proBNP because of the higher analytical and biological variability of NPs (58,77,84). The hs-cTnI and hs-cTnT methods indeed display ideal analytical and pathophysiological characteristics for prognostic biomarkers (44,48,58,60,84) (Table 1).

Combined measurement of BNP/NT-proBNP and hs-cTn

According to the Fourth Universal Determination of Myocardial Infarction (49), published in 2018, the term myocardial injury should be employed when there are elevated concentrations of hs-cTnI or hs-cTnT with at least one value above the 99th percentile URL. There are many cardiac and extracardiac conditions that

Table 1*Biological and analytical characteristics of cardiac troponins as cardiac-specific biomarkers*

Cardiac troponins are optimal cardiac-specific biomarkers because:

- Cardiac troponins are tissue-specific biomarkers, expressed just by cardiomyocytes in healthy subjects.
- Cardiac troponins are more stable in vivo and in vitro than cardiac natriuretic peptides.
- Cardiac troponins can be measured on both plasma (with EDTA or heparin) and serum.
- Reliable laboratory tests for both cardiac troponins are commercially available.
- High-sensitivity methods are available (limit of detection about 1-3 ng/L).
- The concentration value can be measured within 30 minutes with the most diffuse automated platforms.
- Both cardiac troponins have an intra-individual biological variability <10%, while the inter-individual variability is higher (40-50%) because it is correlated to age, sex and body mass (and then cardiac mass).
- Considering that both cardiac troponins have a similar intra-individual variability and also the analytical variability of all the hs-cTnI and T methods at the clinical cut-off is ≤10%, the reference change values are basically equal (<30%) for all assays.

Table 2*Pathophysiological conditions associated to elevation of circulating levels measured using hs-cTnI and hs-cTnT methods due to the presence of myocardial injury, according to the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (49)***Myocardial injury related to acute myocardial ischaemia (related to Type 1 AMI)**

- Atherosclerotic plaque disruption with thrombosis.

Myocardial injury related to acute myocardial ischaemia because of oxygen supply/demand imbalance (related to Type 2 AMI)

Reduced myocardial perfusion, e.g.

- Coronary artery spasm, microvascular dysfunction.
- Coronary embolism.
- Coronary artery dissection.
- Sustained bradyarrhythmia.
- Hypotension or shock.
- Respiratory failure.
- Severe anaemia.

Increased myocardial oxygen demand, e.g.

- Sustained tachyarrhythmia.
- Severe hypertension with or without left ventricular hypertrophy

Other causes of myocardial injury

Cardiac conditions, e.g.

- Heart failure.
- Myocarditis.
- Cardiomyopathy (any type).
- Takotsubo syndrome.
- Coronary revascularization procedure.
- Cardiac procedure other than revascularization.
- Catheter ablation.
- Defibrillator shocks.
- Cardiac contusion.

Systemic conditions, e.g.

- Sepsis, infectious disease.
- Chronic kidney disease.
- Stroke, subarachnoid haemorrhage.
- Pulmonary embolism, pulmonary hypertension.
- Infiltrative diseases, e.g. amyloidosis, sarcoidosis.
- Chemotherapeutic agents.
- Critically ill patients.
- Strenuous exercise.

can produce a myocardial damage in the absence of acute myocardial ischemia (Table 2). Acute myocardial infarction is defined as a myocardial damage with clinical evidence of myocardial ischemia and an increase and/or decrease of hs-cTnI or hs-cTnT with at least one value higher than the 99th percentile URL (49).

Many clinical studies and some meta-analyses have confirmed that there are some individuals with no evidence of cardiac disease who have concentrations of hs-cTnI or hs-cTnT in the third tertile of biomarker values (then still below the 99th percentile URL), who have nonetheless a higher risk of cardiac mortality even in the intermediate term (around 6-12 months) and/or rapid progression toward heart failure (84,85). The combined measurement of NPs and hs-cTn should allow to identify more easily these individuals who have a higher risk (44,77). Indeed, cardiac-specific biomarkers have different but complementary characteristics. Concentrations of NPs and hs-cTn are differently affected by the mechanisms causing cardiac dysfunction and/or damage (43,44,56,57,60). An increase in circulating levels of both biomarkers suggest that the stress mechanisms have already caused relevant alterations of cardiac function (increase in BNP/NT-proBNP) and also a significant damage to cellular structure (increase in hs-cTn) (43,44). Furthermore, experimental and clinical studies report that individuals from the general population or patients with cardiac disease and elevated values of both cardiac biomarkers have worse outcomes than individuals with just one abnormal biomarker (84-86). The same occurs in individuals undergoing non-cardiac surgery. In particular, Moon et al. have performed a retrospective evaluation of 2 490 adult patients undergoing liver transplantation between 2010 and 2018 to define the prognostic value of the measurement of BNP and hs-cTnI before organ transplantation to predict post-transplant mortality (87). The most important results are that the combined measure of cardiac-specific biomarkers predict mortality at 90 days after the transplant (2.9% of subjects). Indeed, patients with both biomarkers elevated above a threshold (400 ng/L for BNP, 60 ng/L for hs-cTnI) displayed an adjusted HR value of 21.19 (95%CI 11.9-37.48, $p < 0.001$) compared with an adjusted HR of 4.23 (95%CI 1.98-9.03, $p < 0.001$) in patients with both biomarkers below threshold, then a HR value about 5-fold higher. Therefore, the measurement of BNP and hs-cTnI before transplantation would help define the priority of liver transplantation in single individuals.

TAKE-HOME MESSAGES

- Both NPs and hs-cTn are useful prognostic indicators in patients undergoing major non-cardiac surgery.
- Although the measurement of NPs is useful to detect cardiac stress, it is not able to discriminate the specific mechanisms causing cardiac dysfunction.
- Myocardial damage is defined as elevated concentrations of hs-cTnI or hs-cTnT with at least one value above the 99th percentile URL (i.e., the 99th percentile of the distribution of biomarker values in the reference population).

- There are many cardiac and extracardiac conditions that can cause a myocardial damage, and clinicians must always search for these conditions.
- The combined measurement of NPs and hs-cTn provides more accurate pathophysiological and clinical information than the measurement of single biomarkers. Therefore, both cardiac-specific biomarkers should be measured when there is a suspicion of cardiovascular disease.
- An increase in both biomarkers suggest that the stress mechanisms have already caused relevant alterations of cardiac function (increase in BNP/NT-proBNP) as well as a significant impairment of cellular structure (increase in hs-cTn).

ASSESSMENT OF MYOCARDIAL DAMAGE IN PATIENTS UNDERGOING MAJOR NON-CARDIAC SURGERY

Several studies have evaluated the changes in circulating hs-cTnI and hs-cTnT in patients undergoing major non-cardiac surgery (6-9,22-42,88-92). The VISION study was a prospective cohort study enrolling 40 004 patients (aged ≥ 45 years, half of them men) undergoing non-cardiac surgery during hospital admission from 2007 to 2013 in 28 centers in 14 countries in North and South America, Asia, Europe, Africa and Australia (91). This study demonstrated a prevalence of MI after non-cardiac surgery (MINS) of 13% (95%CI 12.7-13.3). The prevalence was more common in vascular surgery (633 patients, 24.0%) and less common in urologic or gynecologic surgery (503 patients, 10.4%). Furthermore, the occurrence of MINS was significantly associated to 30-day mortality (314 deaths; adjusted HR 2.2, 95%CI 1.9-2.6) and was one of the main causes of death (91). cTnT levels were measured 6-12 hours after the surgery and on day 1, 2 and 3 after surgery using a not hs method, thus possibly underestimating the prevalence of MINS. Only the most recent studies have used hs-cTnI and hs-cTnT methods to detect the presence of MINS in patients undergoing extra-cardiac surgery (34,37,40,41,88,89). The most important elements of experimental design and results of studies using hs-cTnI (one study) and hs-cTnT (five studies) are summarized in Table 3. In two retrospective studies, the prevalence of MINS was 9% in a Spanish study where hs-cTnI was measured (41) and 3.5% in an US study where hs-cTnT was measured (91). The other 4 studies (34,37,40,88) wished to evaluate the association between hs-cTnT and peri-operative cardiovascular risk. Despite the large differences in term of experimental design, number of enrolled patients, type of surgery and results of surgery, the rate of mortality was clearly higher in patients with MINS than those without (34,37,40,88). Additionally, patients with MINS had more often other important complications such as sepsis or bleeding (37,40).

A study published in 2012 evaluated 46 539 adult patients undergoing non-cardiac surgery in 498 hospitals in 28 European countries (93). In this study, 1 855 patients (4%) died before discharge, 3,599 (8%) were admitted

Table 3

Studies using hs-cTnI and hs-cTnT methods for cardiovascular risk evaluation in patients undergoing major non cardiac surgery

Authors (year)	Method	Type of Study	Enrolled Population	Statistical results	Ref.
Górka et al. (2018)	hs-cTnT	Prospective observational cohort study	164 adult patients (≥ 45 years, men 79.9%, mean age 66.1 ± 9.1 years) undergoing surgery for PAD (88.4%) or AAA (23.8%).	1-year mortality was higher in patients with MINS (23.1%), evaluated by increased hs-cTnT, than non-MINS patients (7.2%; $p = 0.006$)	34
Ackland et al. (2020)	hs-cTnT	Prospective multicentre observational cohort study	4335 patients aged ≥ 45 years undergoing elective noncardiac surgery (mean age, 65 ± 11 years, men 54.9%).	Patients with elevated troponin (49.8%) have more frequently noncardiac morbidity (OR: 1.95; 95%CI: 1.69-2.25), and are also at higher risk of infectious morbidity (OR: 1.54; 95%CI: 1.24-1.91) and critical care utilisation (OR: 2.05; 95%CI: 1.73-2.43).	37
Costa et al. (2021)	hs-cTnT	Prospective multicentre observational cohort study	2504 adult (≥ 45 years) patients (mean age 61.9 ± 11.0 years; men 49%) undergoing noncardiac surgery at 2 tertiary hospitals.	MINS, evaluated by increased hs-cTnT within 30 days after noncardiac surgery, was related to higher mortality (HR: 3.17, 95%CI: 1.56-6.41), major bleeding (HR 5.76; 95%CI 2.75-12.05), sepsis (HR: 5.08; 95%CI: 2.25-11.46), and active cancer (HR 4.22, 95%CI 1.98-8.98).	40
Serrano et al. (2021)	hs-cTnI	Prospective cohort with retrospective analysis. Multivariable logistic regression analysis was used to study risk factors associated with MINS, evaluated by increased hs-cTnI.	3363 adult (≥ 45 years) patients (mean age 72.9 ± 11.7 years; men 47.1%) undergoing major non-cardiac surgery.	The incidence of MINS was 9%. Preoperative risk factors that increased the risk of MINS were age, ASA classification and vascular surgery.	41
Kler et al. (2021)	hs-cTnT	Retrospective single centre study	109 consecutive patients (men 48.6%) who underwent open pancreaticoduodenectomy (median age 66 years, range 20-85 years)	ROC curves demonstrated a strong correlation between elevated mean hsTnT and 30-day (AUC=0.937), 90-day (AUC=0.852) mortality and MACE (AUC=0.779). In multivariate analysis hs-TnT was significantly associated with 90-day mortality (OR: 43.928, $p = 0.004$) and MACE (OR: 8.177, $p = 0.048$).	88
Turan et al. (2021)	hs-cTnT	Single centre retrospective analysis	4480 of adults (≥ 45 years) with routine postoperative TnT monitoring after noncardiac surgery (mean age 62.9 years, men 51.1%)	The incidence of MINS was 155/4480 (3.5%). Lower postoperative haemoglobin values associated with MINS.	91

PAD: vascular surgery for peripheral artery disease; AAA: abdominal aortic aneurysm; MINS: myocardial injury after non-cardiac surgery; ASA: American Status Anaesthesiology; MACE: major adverse cardiovascular events.

in intensive care unit after surgery for a median of 1.2 days (0.9-3.6); 1,358 of the deceased patients (73%) were not admitted to intensive care unit after surgery (93). Nevertheless, the raw rates of mortality were highly different across countries (from 1.2%, 95%CI 0.0-3.0 in Islanda to 21.5%, 95%CI 16.9-26.29 in Lettonia), likely because of cultural, demographic, socio-economic and political differences between nations, all factors that affect the outcomes of surgery (93).

Overall, the data in Table 3 confirm that myocardial damage, evaluated with the hs-cTnI and hs-cTnT methods, is frequently observed in patients undergoing major non-cardiac surgery, particularly in more elderly patients or those with cardiac or extra-cardiac morbidity (34,37,40,41,88,91). These studies also confirm that increased hs-cTnI and hs-cTnT above the 99th percentile URL are significantly associated with an increased risk of mortality or MACE (34,37,40,88).

CLINICAL CONSIDERATIONS ON THE MEASURE OF CARDIAC-SPECIFIC BIOMARKERS IN PATIENTS UNDERGOING MAJOR NON-CARDIAC SURGERY

Several technical aspects, surgical factors and clinical conditions may influence the evaluation and/or clinical interpretation of cardiac-specific biomarkers in patients undergoing major non-cardiac surgery. Some of these factors deserve a more detailed discussion.

Clinical relevance of the measurement of biomarkers before surgery

The stress induced by surgery and the anesthesia may cause myocardial ischemia by increasing oxygen requirements, reducing oxygen availability or by the combination of these mechanisms (8). According to the 2014 ESC/ESA Guidelines, the main goal of pre-operative evaluation is to search for and manage the cardiovascular risk factors in patients undergoing surgery (8). These Guidelines recommend to consider BNP and NT-proBNP measurement to predict the risk of peri-operative and late cardiac events in patients at high risk (class IIb, level B). cTn should be measured in patients at high risk, both before and 48-72 hours after major surgery (class IIb, level B). On the other hand, a systematic screening of cardiac biomarkers before surgery is not recommended (class III, level C) (8).

The Authors of the present document deem that NPs and hs-cTnI or T should always be measured before surgery (8,23), particularly in patients with a higher risk, for example because of their age (>65 years) and/or comorbidities (84,85). This proposal is based on pathophysiological considerations and the results of the most recent clinical studies (Table 3).

The prognostic information from the measurement of BNP/NT-proBNP and hs-cTn is independent and complementary to other important indicators of risk, such as those deriving from ECG and imaging techniques (6,8,23). Elevated levels of cardiac-specific biomarkers before surgery are associated with a markedly

higher risk of MACE during the peri-operative period (34,35,37,40,87,88). Importantly, if a preoperative measurement is not performed, it is impossible to assess the specific contribution of surgery to the increase in cardiac biomarkers observed during or just after the surgery.

The measurement of hs-cTnI or T can identify subjects free from symptomatic cardiac disease but having a higher cardiovascular risk. These subjects have hs-cTn values in the third tertile or even above the 99th percentile URL (84,85,94). Importantly, many cardiac and non-cardiac conditions may cause a myocardial damage, particularly in elderly patients with comorbidities (Table 2). Furthermore, the detection of high cardiac-specific biomarkers during the preoperative evaluation can prompt clinicians to perform further non-invasive or invasive cardiac tests to identify the underlying cardiac disease and then obtain further information on the clinical condition of the patient (2,8).

Effects of cardiac-protective drugs

Patients undergoing major non-cardiac surgery with increased concentrations of cardiac biomarkers, and then with a higher risk of peri-operative MACE, should be protected through cardiac-protective medications (8). According to ESC/ESA Guidelines, beta-blocker therapy may be considered before high-risk surgery if patients have at least 2 classic clinical risk factors or score at least 3 on the American Society of Anesthesiologists scale (class IIb, level B). Furthermore, beta-blockers before surgery might be considered also in patients with a history of ischemic cardiac disease or myocardial ischemia (class IIb, level B) (8).

The primary objective of a cardiac-protective therapy is to reduce the stress to the heart by counteract neurohormonal and immune activation (51,57,62,95). As a result, a continuous therapy with cardiac protective drugs such as beta-blockers, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) or angiotensin receptor blockers (ARB) tends to reduce circulating levels of biomarkers in patients with cardiac disease (51,57,62,95). Even diuretics, often prescribed to patients with hypertension or heart failure, should be maintained in patients undergoing major non-cardiac surgery (8). A continued therapy with diuretics tends to reduce NP levels (51,57,62).

Chronic heart failure

Heart failure is a well-established predictor of peri- and post-operative cardiac events and is included in several algorithms for risk prediction (8,96-98). In a study on a registry of 160 000 Medicare procedures including patients aged ≥ 65 years, heart failure was found in 18% of cases and was associated with a 63% higher risk of surgical mortality and a 51% higher risk of 30-day readmission for all causes compared to patients with coronary artery disease but no heart failure (96). In particular, a study reported that a left ventricular ejection fraction (LVEF) $\leq 35\%$ is a strong predictor of cardiac events after vascular surgery (98). Circulating NP levels

are increased in patients with acute or chronic HF, with reduced or preserved EF (8,47).

Preoperative NP levels are strongly correlated with the outcome of patients with heart failure and with the peri- and post-operative morbidity and mortality (6,8,18,99). Furthermore, compared to a single pre-operative measurement of BNP/NT-proBNP, their post-operative measurement improves risk stratification for the composite outcome of death or non-fatal MI at 30 days and ≥ 180 days after non-cardiac surgery (20). Based on this evidence (6,18,20,99), Guidelines recommend that NPs are routinely measured before non-cardiac surgery when a cardiac dysfunction is known or suspected (8).

hs-cTnI and T are often elevated in patients with chronic HF, particularly those aged >65 years or with comorbidities (43-47,50), suggesting the presence of heart failure associated with myocardial damage (usually not acute). Furthermore, the start of a specific therapy should be considered at least one week before surgery in stable patients with systolic HF (class IIa, level C) (8).

Importantly, some drugs such as ACEi or ARB tend to reduce circulating levels of both cardiac-specific biomarkers (43,44,50,60,95). In particular, sacubitril/valsartan has complex effects on the metabolism of NPs (100, 101). Therefore, clinicians should consider both the clinical conditions and the analytical characteristics of methods for BNP/NT-proBNP measurement to correctly interpret changes in biomarker levels, especially in patients undergoing major non-cardiac surgery and receiving sacubitril/valsartan, during the first month of treatment with this drug (100,101).

Cardiac arrhythmias

Cardiac arrhythmias are common causes of morbidity and mortality during the peri-operative period (8). A systematic revision including 14 studies found that increased levels of BNP or NT-proBNP can identify patients at risk for post-operative atrial fibrillation (AF) after surgery, particularly after lung or esophageal resection (102). AF is the most common cardiac arrhythmia. Its prevalence increases with age, with a prevalence $<0.2\%$ in adults <55 years and around 10% in those aged ≥ 85 years, and is higher in men (103). Arrhythmias such as AF and ventricular tachycardia often denote an underlying structural cardiac disease (104). AF is an important risk factor for ischemic stroke (103). 2022 US Preventive Services Task Force (USPSTF) Guidelines state that the current evidence does not allow to assess the cost-effectiveness of a screening for AF in asymptomatic adults by intermittent or continuous screening strategies, with ECG or photoplethysmography (103). Nonetheless, the finding of these arrhythmias before surgery should lead to a cardiac evaluation including echocardiography (8).

Patients with AF usually have elevated values of BNP/NT-proBNP (usually, during acute episodes, over 5-fold higher than reference limits) (44). Due to their higher turnover *in vivo*, concentrations of NPs tend to decrease rapidly after an acute arrhythmic episode (BNP more rapidly than NT-proBNP), and reach values

within the reference limits if no cardiac dysfunction is present (44,97). Increased values of hs-cTn are found in 10-15% of patients with AF and suggest a structural cardiac disease, pointing to a high cardiac risk.

Myocardial infarction

Values of BNP/NT-proBNP and hs-cTn above the threshold values before surgery denote a myocardial damage (44,49,50,60,72,73). To confirm an acute myocardial damage in a patient with evidence of acute myocardial ischemia, the measurement of hs-cTnI or T on at least two blood samples during the peri-operative period is needed (49) (Table 2). Recent studies confirm that the increase in hs-cTnI and T above the 99th percentile URL is significantly associated with a higher risk of death or MACE (34,37,40,41,88,91) (Table 3). 2014 ESC/ESA Guidelines recommend to consider myocardial revascularization before a high-risk surgery when there is evidence of inducible ischemia (class IIb, level B). Revascularization is not routinely recommended before low- or intermediate-risk surgery in patients with myocardial ischemia (class III, level B).

Even in patients undergoing major non-cardiac surgery, the diagnosis of MI during or after surgery should be performed through the measurement of changes in hs-cTnI or T (49,67-70,105). In particular, in patients with suspected MI without ST-segment elevation (NSTEMI), the preference for more rapid algorithms (with a repeated measurement within 3 hours) is justified by considering that an earlier diagnosis allow an earlier treatment and then the salvage of myocardium not irreversibly damaged (68,70,105).

TAKE-HOME MESSAGES

- *The systematic assessment of results from recent studies confirms that myocardial damage, evaluated through hs-cTnI and T methods, can be frequently observed in patients undergoing major non-cardiac surgery, particularly in elderly patients or those with cardiac or non-cardiac morbidity.*
- *These studies confirm that hs-cTnI and T above the 99th percentile URL are associated with an increased risk of death or MACE.*
- *2014 ESC/ESA Guidelines recommend that BNP/NT-proBNP measurement be considered for the prognostic evaluation of peri-operative and late cardiac events in high-risk patients (class IIb, level B). Furthermore, cTn should be evaluated in patients at high risk, both before and 48-72 hours after major surgery (class IIb, level B). However, the routine measurement before surgery is not recommended for risk stratification and to prevent cardiac events (class III, level C).*
- *2014 ESC/ESA Guidelines recommend that pre-operative administration of beta-blockers be considered in patients before a high-risk surgery if they have at least two classical risk factors or a score 3 based on the ASA classification (class IIb, level B). Furthermore, pre-operative treatment with beta-*

- blockers might be considered also in patients with history of ischemic cardiac disease (class IIb, level B).*
- *2014 ESC/ESA Guidelines recommend that specific therapy for heart failure is continued during the surgery in stable patients with systolic heart failure (class IIa, level C).*
 - *A continuous therapy with the most used cardiac protective drugs (such as beta-blockers, ACEi or ARB) tends to reduce circulating levels of cardiac biomarkers in patients with heart disease.*
 - *Patients with AF usually present high levels of BNP/NT-proBNP, which usually fall within the reference limits after the acute arrhythmic episode and with the restoration of sinus rhythm, unless cardiac disease is present. Increased hs-cTn values are found in about 10-15% of patients with AF and suggest a structural heart disease, then the presence of a myocardial damage, pointing to a high cardiac risk. Even in patients undergoing major non-cardiac surgery, the diagnosis of MI during or after the intervention must be done through the evaluation of changes in hs-cTn or T changes, according to recent Guidelines.*

FUTURE PERSPECTIVES

Further clinical studies are needed to define if a strategy based on the measure of cardiac-specific biomarkers before surgery significantly improves both patient outcomes and cost/benefit ratio. Another important question is if the combined measure of both cardiac-specific biomarkers adds significant information to the measurement of a single biomarker (BNP/NT-proBNP or hs-cTn). Importantly, hs-cTn can be considered an ideal cardiac biomarker because of its specificity, relatively low-cost and the possibility to obtain results through an automated platform within 20-30 minutes (45,48,50,58-60) (Table 1). Some point-of-care (POCT) methods recently introduced on the market can measure hs-cTnI using just a blood drop with similar analytical performance than assays for hs-cTnI using completely automated platforms (106,107). Therefore, these new POCT hs-cTnI methods can allow a more rapid diagnosis of myocardial damage at the bedside of the patient, in the outpatient clinic, in intensive care units or in the surgery room (106,107).

CONCLUSIONS

Several recent studies have demonstrated the clinical relevance of the measure of cardiac-specific biomarkers to evaluate the cardiovascular risk before major non-cardiac surgery, particularly for the identification of MINS through hs-cTn assays. The Authors believe that BNP/NT-proBNP and hs-cTn should be measured in all patients during the clinical evaluation before surgery, particularly during intermediate- or high-risk surgery, in patients aged >65 years and/or with comorbidities. Several questions remain to be assessed in dedicated clinical studies, such as how to optimize the management of patients with raised cardiac specific biomarkers before

surgery, and whether a strategy based on biomarker measurement improves patient outcomes and is cost-effective.

FINAL RECOMMENDATIONS

- *The prognostic information from the measurement of cardiac-specific biomarkers is independent and complementary to other important indicators of cardiac risk, such as ECG and imaging findings, in patients undergoing non-cardiac surgery.*
- *Elevated values of both cardiac-specific biomarkers (BNP/NT-proBNP and hs-cTn) before surgery are associated with a markedly higher risk of MACE in the peri-operative period.*
- *Elevated values of cardiac-specific biomarkers before surgery should suggest the need for a pathophysiological and clinical evaluation of the condition responsible for cardiac dysfunction and myocardial damage.*
- *Changes in hs-cTn values during the peri-operative period should be evaluated according to recommendations of international Guidelines for the diagnosis of MI.*
- *The Authors of this document deem that NPs and hs-cTn should always be measured before major non-cardiac surgery, particularly in patients with a higher cardiovascular risk before of their age (>65 years) and/or comorbidities.*

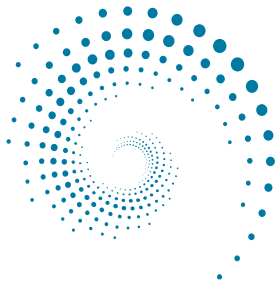
REFERENCES

1. Priebe HJ. Peri-operative myocardial infarction: aetiology and prevention. *Br J Anaesth* 2005;95:3-19.
2. Devereaux PJ, Goldman L, Cook DJ, et al. Perioperative cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery: a review of the magnitude of the problem, the pathophysiology of the events and methods to estimate and communicate risk. *Can Med Assoc J* 2005;173:627-34.
3. Struthers A, Lang C. The potential to improve primary prevention in the future by using BNP/N-BNP as an indicator of silent 'pancardiac' target organ damage: BNP/N-BNP could become for the heart what microalbuminuria is for the kidney. *Eur Heart J* 2007;28:1678-82.
4. Poldermans D, Hoeks SE, Feringa HH. Pre-operative risk assessment and risk reduction before surgery. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1913-24.
5. Poldermans D, Bax JJ, Boersma E, et al. Task force for preoperative cardiac risk assessment and perioperative cardiac management in non-cardiac surgery; European Society of Cardiology (ESC). Guidelines for pre-operative cardiac risk assessment and perioperative cardiac management in non-cardiac surgery. *Eur Heart J* 2009;30:2769-812.
6. Devereaux PJ, Chan MT, Alonso-Coello P, et al. Association between postoperative troponin levels and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery. *J Am Med Assoc* 2012;307:2295-304.
7. Grobden RB, Van Klei WA, Grobbee DE, et al. The aetiology of myocardial injury after non-cardiac surgery. *Neth Heart J* 2013;21:380-8.
8. Kristensen SD, Knuuti J, Saraste A, et al. 2014 ESC/ESA guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular

- assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur Heart J* 2014;35:2383-431.
9. Karakas M, Koenig W. Improved peri-operative risk stratification in non-cardiac surgery: going beyond established clinical scores. *Eur Heart J* 2013;34:796-8.
 10. Clerico A, Emdin M, Passino C. Cardiac biomarkers and risk assessment in patients undergoing major non-cardiac surgery: time to revise the guidelines? *Clin Chem Lab Med* 2014;52:959-63.
 11. Kalesan B, Nicewarner H, Intwala S, et al. Pre-operative stress testing in the evaluation of patients undergoing non-cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2019;14:e0219145.
 12. Cao D, Chandiramani R, Capodanno D, et al. Non-cardiac surgery in patients with coronary artery disease: risk evaluation and periprocedural management. *Nat Rev Cardiol* 2021;18:37-57.
 13. Duceppe E, Parlow J, MacDonald P et al. Canadian Cardiovascular Society guidelines on perioperative cardiac risk assessment and management for patients who undergo noncardiac surgery. *Can J Cardiol* 2017;33:17-32.
 14. Karthikeyan G, Moncur RA, Levine O, et al. Is a pre-operative brain natriuretic peptide or N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement an independent predictor of adverse cardiovascular outcomes within 30 days of noncardiac surgery? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1599-606.
 15. Oscarsson A, Fredrikson M, Sörliden M, et al. Predictors of cardiac events in high-risk patients undergoing emergency surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009;53:986-94.
 16. Ryding AD, Kumar S, Worthington AM, et al. Prognostic value of brain natriuretic peptide in noncardiac surgery: a meta-analysis. *Anesthesiology* 2009;111:311-9.
 17. Rodseth RN, Padayachee L, Biccard BM. A meta-analysis of the utility of pre-operative brain natriuretic peptide in predicting early and intermediate-term mortality and major adverse cardiac events in vascular surgical patients. *Anaesthesia* 2008;63:1226-33.
 18. Biccard BM, Lurati Buse GA, Burkhart C, et al. The influence of clinical risk factors on pre-operative B-type natriuretic peptide risk stratification of vascular surgical patient. *Anaesthesia* 2012;67:55-9.
 19. Beattie WS, Wijeyesundera DN. Perioperative cardiac biomarkers: the utility and timing. *Curr Opin Crit Care* 2013;19:334-41.
 20. Rodseth RN, Biccard BM, Le Manach Y, et al. The prognostic value of pre-operative and post-operative B-type natriuretic peptides in patients undergoing noncardiac surgery: B-type natriuretic peptide and N-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:170-80.
 21. Young YR, Sheu BF, Li WC, et al. Predictive value of plasma brain natriuretic peptide for postoperative cardiac complications; a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care* 2014;29:696.e1-10.
 22. Domanski MJ, Mahaffey K, Hasselblad V, et al. Association of myocardial enzyme elevation and survival following coronary artery bypass graft surgery. *J Am Med Ass* 2011;305:585-91.
 23. Borges FK, Devereaux PJ. Physicians should obtain perioperative cardiac toponin measurements in at-risk patients undergoing noncardiac surgery. *Clin Chem* 2021;67:50-3.
 24. Borges FK, Furtado MV, Rossini AP, et al. Clinical use of ultrasensitive cardiac troponin I assay in intermediate- and high-risk surgery patients. *Dis Markers* 2013;35:945-53.
 25. Braga JR, Tu JV, Austin PC, et al. Outcomes and care of patients with acute heart failure syndromes and cardiac troponin elevation clinical perspective. *Circ Heart Fail* 2013;6:193-202.
 26. Weber M, Luchner A, Seeberger M, et al. Incremental value of high-sensitive troponin T in addition to the revised cardiac index for peri-operative risk stratification in non-cardiac surgery. *Eur Heart J* 2013;34:853-62.
 27. Wolfgang CL. Role of fourth-generation troponin in predicting mortality in noncardiac surgery. *JAMA Surg* 2013;148:12-3.
 28. Botto F, Alonso-Coello P, Chan MT, et al. Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes. *Anesthesiology* 2014;120:564-78.
 29. Foucrier A, Rodseth R, Aissaoui M, et al. The long-term impact of early cardiovascular therapy intensification for postoperative troponin elevation after major vascular surgery. *Anesth Analg* 2014;119:1053-63.
 30. Ekeloef S, Alamili M, Devereaux PJ, et al. Troponin elevations after non-cardiac, non-vascular surgery are predictive of major adverse cardiac events and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Br J Anaesth* 2016;117:559-68.
 31. Devereaux PJ, Biccard BM, Sigamani A, et al. Writing Committee for the VISION Study Investigators. Association of postoperative high-sensitivity troponin levels with myocardial injury and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery. *J Am Med Assoc* 2017;317:1642-51.
 32. Macfarlane AI, Rudd D, Knight E, et al. Prospective controlled cohort study of Troponin I levels in patients undergoing elective spine surgery for degenerative conditions: Prone versus supine position. *J Clin Neurosci* 2017;35:62-6.
 33. Suzumura EA, Ribeiro RA, Kawano-Dourado L, et al. Effects of perioperative statin use on cardiovascular complications in patients submitted to non-cardiac surgery: protocol for a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Syst Rev* 2017;6:116.
 34. Górka J, Polok K, Fronczek J, et al. Myocardial injury is more common than deep venous thrombosis after vascular surgery and is associated with a high one year mortality risk. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2018;56:264-70.
 35. Humble CAS, Huang S, Jammer I, et al. Prognostic performance of preoperative cardiac troponin and perioperative changes in cardiac troponin for the prediction of major adverse cardiac events and mortality in noncardiac surgery: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2019;14:e0215094.
 36. Zhu H, Xu X, Fang X, et al. Effects of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation (nicorandil) in patients with angina pectoris undergoing elective percutaneous coronary interventions: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* 2019;98:e14165.
 37. Ackland GL, Abbott TEF, Jones TF, et al. VISION-UK Investigators. Early elevation in plasma high-sensitivity troponin T and morbidity after elective noncardiac surgery: prospective multicentre observational cohort study. *Br J Anaesth* 2020;124:535-43.
 38. Borg Caruana C, Jackson SM, Ngyuen Khuong J, et al. Systematic review and meta-analysis of postoperative troponin as a predictor of mortality and major adverse

- cardiac events after vascular surgery. *J Vasc Surgery* 2020;72:1132-43.
39. Lowe MJ, Lighfoot NJ. The prognostic implication of perioperative cardiac enzyme elevation in patients with fractured neck of femur: A systematic review and meta-analysis. *Injury* 2020;51:164-73.
 40. Costa MCDBG, Furtado MV, Borges FK, et al. Perioperative troponin screening identifies patients at higher risk for major cardiovascular events in noncardiac surgery. *Curr Probl Cardiol* 2021;46:1000429.
 41. Serrano AB, Gomez-Rojo M, Ureta E, et al. Preoperative clinical model to predict myocardial injury after non-cardiac surgery: a retrospective analysis from the MANAGE cohort in a Spanish hospital. *BMJ open* 2021;11:e045052.
 42. Vasireddi SK, Pivato E, Soltero-Mariscal E, et al. Postoperative myocardial injury in patients classified as low risk preoperatively is associated with a particularly increased risk of long-term mortality after noncardiac surgery. *J Am Heart Assoc* 2021;10:e019379.
 43. Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing impact of laboratory medicine in cardiology practice. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:748-63.
 44. Perrone MA, Zaninotto M, Masotti S, et al. The combined measurement of high-sensitivity cardiac troponins and natriuretic peptides: a useful tool for clinicians? *J Cardiovasc Med* 2020;21:953-63.
 45. Perrone MA, Storti S, Salvadori S, et al. Cardiac troponins: are there any differences between T and I? *J Cardiovasc Med* 2021;22:797-805.
 46. Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and aminoterminal ProBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1289-97.
 47. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021;42:3599-726.
 48. Clerico A, Giannoni A, Prontera T, et al. High-sensitivity troponin: a new tool for pathophysiological investigation and clinical practice. *Adv Clin Chem* 2009;49:1-30.
 49. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2231-64.
 50. Passino C, Aimo A, Masotti S, et al. Cardiac troponins as biomarkers for cardiac disease. *Biomark Med* 2019;13:325-30.
 51. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, et al. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H12-20.
 52. van der Meer P, Gaggin HK, Dec GW. ACC/AHA Versus ESC Guidelines on Heart Failure: JACC Guideline Comparison. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:2756-68.
 53. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006;17:1726-33.
 54. Cordey J, Schneider M, Buhler M. The epidemiology of fractures of the proximal femur. *Injury* 2000;31 Suppl 3:C56-61.
 55. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2009;119:2408-18.
 56. Wang TJ. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* 2011;123:551-65.
 57. Braunwald E. Heart Failure. *J Ac Coll Cardiol Heart Fail* 2013;1:1-20.
 58. Clerico A, Zaninotto M, Padoan A, et al. Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cTnI and cTnT: From theory to practice. *Adv Clin Chem* 2019;93:239-62.
 59. Clerico A, Zaninotto M, Passino C, et al. High-sensitivity methods for cardiac troponins: The mission is not over yet. *Adv Clin Chem* 2021;103:215-52.
 60. Clerico A, Passino C, Franzini M, et al. Cardiac biomarker testing in the clinical laboratory: Where do we stand? General overview of the methodology with special emphasis on natriuretic peptides. *Clin Chim Acta* 2015;443:17-24.
 61. Emdin M, Aimo A, Vergaro G, et al. Natriuretic peptides. D'où venons-nous? Que sommes-nous? Où allons-nous? *Int J Cardiol* 2018;254:256-7.
 62. Pastormerlo LE, Maffei S, Latta DD, et al. N-terminal pro-type natriuretic peptide is a marker of vascular remodelling and subclinical atherosclerosis in asymptomatic hypertensives. *Eur J Prev Cardiol* 2016;23:366-76.
 63. Schaub JA, Coca SG, Moledina DG, et al. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide for diagnosis and prognosis in patients with renal dysfunction: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol Heart Fail* 2015;3:977-89.
 64. Clerico A, Zucchelli GC, Pilo A, et al. Clinical relevance of biological variation: the lesson of brain natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP assay. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:366-78.
 65. Fraser CG. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2011;50:807-12.
 66. Clerico A, Zaninotto M, Prontera C, et al. State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: the CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta* 2012;414:112-9.
 67. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
 68. Collet JP, Thiele H, Barbato E, et al. The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2021;42:1289-387.
 69. Apple FS, Collinson PO, Kavsak PA, et al. The IFCC clinical application of cardiac biomarkers committee's appraisal of the 2020 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Getting cardiac troponin right. *Clin Chem* 2021;67:730-5.
 70. NICE. High-sensitivity troponin tests for the early rule out of NSTEMI. Diagnostics guidance. 2020 www.nice.org.uk/guidance/dg40. (ultimoaccesso: marzo 2022)
 71. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015;161:1566-75.
 72. Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
 73. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018;6:553-60.
 74. Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem*

- 2014;60:455-62.
75. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, et al. IFCC Task Force on clinical application of cardiac bio-markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem* 2017;63:73-81.
 76. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli M, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology, and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
 77. Clerico A, Padoan A, Zaninotto M, et al. Clinical relevance of biological variation of cardiac troponins. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:451-52.
 78. Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: A multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.
 79. Clerico A, Ripoli A, Zaninotto M, et al. Head-to-head comparison of plasma cTnI concentration values measured with three high-sensitivity methods in a large Italian population of healthy volunteers and patients admitted to emergency department with acute coronary syndrome: a multi-center study. *Clin Chim Acta* 2019;496:25-34.
 80. Ndreu R, Musetti V, Masotti S, et al. Evaluation of the cTnT immunoassay using quality control samples. *Clin Chim Acta* 2019;495:269-70.
 81. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
 82. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e174-6.
 83. Musetti V, Masotti S, Prontera C, et al. Evaluation of the analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:e229-e231.
 84. Clerico A, Zaninotto M, Passino C, et al. Evidence on clinical relevance of cardiovascular risk evaluation in the general population using cardio-specific biomarkers. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:79-90.
 85. Farmakis D, Mueller C, Apple FS. High-sensitivity cardiac troponin assays for cardiovascular risk stratification in the general population. *Eur Heart J* 2020;41:4050-6.
 86. du Fay de Lavallaz J, Badertscher P, Nestelberger T, et al. B-type natriuretic peptides and cardiac troponins for diagnosis and risk-stratification of syncope. *Circulation* 2019;139:2403-18.
 87. Moon YJ, Kwon HM, Jung KW, et al. Preoperative high-sensitivity troponin I and B-type natriuretic peptide, alone and in combination, for risk stratification of mortality after liver transplantation. *Korean J Anesthesiol* 2021;74:242-53.
 88. Kler A, Dave M, Blatzis M, et al. Elevation of high-sensitive Troponin T predicts mortality after open pancreaticoduodenectomy. *World J Surg* 2021;45:1913-20.
 89. Lee S, Allen AJH, Morley E, et al. Perioperative myocardial injury risk after elective knee and hip arthroplasty in patients with a high risk of obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2021;25:513-5.
 90. Sousa J, Rocha-Neves J, Oliveira-Pinto J, et al. Myocardial injury after non-cardiac surgery (MINS) in EVAR patients: a retrospective single-centered study. *J Cardiovasc Sur (Torino)* 2021;62:130-5.
 91. Turan A, Cohen B, Rivas E, et al. Association between postoperative haemoglobin and myocardial injury after noncardiac surgery: a retrospective cohort analysis. *Br J Anaesthesiol* 2021;126:94-101.
 92. Spence J, LeManach Y, Chan MTV, et al. Vascular events in noncardiac surgery patients cohort evaluation (VISION) study investigators. Association between complications and death within 30 days after noncardiac surgery. *CMAJ* 2019;191:E830-7.
 93. Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, et al. Mortality after surgery in Europe: a 7-day cohort study. *Lancet* 2012;380:1059-65.
 94. Aimo A, Georgiopoulos G, Panichella G, et al. High-sensitivity troponins for outcome prediction in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Eur Int Med* 2022;S0953-6205(22)00012-7. doi: 10.1016/j.ejim.2022.01.012. Online ahead of print.
 95. Emdin M, Clerico A, Clemenza F, et al. Recommendations for the clinical use of cardiac natriuretic peptides. *Ital Heart J* 2005;6:430-46.
 96. Hammill BG, Curtis LH, Bennett-Guerrero E, et al. Impact of heart failure on patients undergoing major noncardiac surgery. *Anesthesiology* 2008;108:559-67.
 97. Upshaw J, Kiernan MS. Pre-operative cardiac risk assessment for noncardiac surgery in patients with heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2013;10:147-56.
 98. Kazmers A, Cerqueira MD, Zierler RE. Peri-operative and late outcome in patients with left ventricular ejection fraction of 35% or less who require major vascular surgery. *J Vasc Surg* 1988;8:307-15.
 99. Rajagopalan S, Croal BL, Reeve J, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is an independent predictor of all-cause mortality and MACE after major vascular surgery in medium-term follow-up. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;41:657-62.
 100. Clerico A, Zaninotto M, Passino C, et al. New issues on measurement of B-type natriuretic peptides. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:32-9.
 101. Aimo A, Vergaro G, Passino C, et al. Evaluation of pathophysiological relationships between renin-angiotensin and ACE-ACE2 systems in cardiovascular disorders: from theory to routine clinical practice in patients with heart failure. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2021;58:530-45.
 102. Toufektzian L, Zisis C, Balaka C, et al. Effectiveness of brain natriuretic peptide in predicting postoperative atrial fibrillation in patients undergoing non-cardiac thoracic surgery. *Interact Cradiovasc Thorac Surg* 2015;20:654-7.
 103. Davidson KW, Barry MJ, Mangione CM, et al. US Preventive Services Task Force. Screening for atrial fibrillation: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA* 2022;327:360-7.
 104. Chang KW, Hsu JC, Toomu A, et al. Using biomarkers to guide heart failure management. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2017;15:729-41.
 105. Clerico A, Zaninotto M, Aimo A, et al. Use of high-sensitivity cardiac troponins in the emergency department for the early rule-in and rule-out of acute myocardial infarction without persistent ST-segment elevation (NSTEMI) in Italy. *Clin Chem Lab Med* 2021;60:169-82.
 106. Collinson PO, Saenger AK, Apple FS, IFCC C-CB. High sensitivity, contemporary and point-of-care cardiac troponin assays: educational aids developed by the IFCC Committee on Clinical Application of Cardiac Bio-Markers. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:623-32.
 107. Clerico A, Zaninotto M, Plebani M. High-sensitivity assay for cardiac troponins with POCT methods. The future is soon. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1477-8.



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*.