

---

---

# BC

---

---

## biochimica clinica

**In questo numero:**

**DOCUMENTI SIBioC:**

**RIDURRE L'INAPPROPRIATEZZA IN MEDICINA  
DI LABORATORIO: COME, QUANDO E PERCHÈ**

*vedi pag. 305*

**LA VARIABILITÀ PREANALITICA IN COAGULAZIONE**

*vedi pag. 313*

**INTERFERENZA DA BIOTINA NEGLI IMMUNODOSAGGI**

*vedi pag. 327*



SIBioC - Medicina di Laboratorio  
membro di

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



 **BIOMEDIA**  
La condivisione del sapere

# sommario

3

## EDITORIALE

255

La determinazione dell'insulina richiede particolari attenzioni  
*A. Mosca*

## RASSEGNE

256

La spettrometria di massa nella diagnosi e nel monitoraggio delle gammopatie monoclonali  
*P. Milani, G. Palladini*

264

La diagnostica di laboratorio nella sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi  
*E. Danese, D. Negrini, G. L. Salvagno, C. Zaltron, O. Olivieri, G. Lippi, F. Pizzolo*

## CONTRIBUTI SCIENTIFICI

269

URIT 11F dipstick for proteinuria testing: comparison with quantitative protein assay and evaluation of the diagnostic accuracy for proteinuria detection in a outpatient population  
*T. Köken, N. Doğan*

273

L'interferenza dell'emolisi sulla misura dell'insulina  
*F. de Liso, L. Maldari, P. De Corato, M. Speroni, R. Maiavacca, F. Ceriotti*

278

Telomere shortening and PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer mucosae  
*M. Benati, E. Danese, M. Montagnana, E. Paviati, A. M. Minicozzi, M. Gusella, F. Pasini, G. Lippi*

284

Procalcitonin levels in Sjögren syndrome  
*B. A. Tarim, M. E. Tezcan, A. Orcun, M. Aliustaoglu, O. Keskin*

289

Galectin-3 and Lp(a) plasma concentrations and advanced carotidatherosclerotic plaques: correlation with plaque presence and features  
*D. Palma, L. Agnello, M. D. Di Taranto, C. Giacobbe, M. Savoia, A. Travaglio, B. Lo Sasso, L. Del Guercio, U. M. Bracale, M. Ciaccio, G. Fortunato*

## DOCUMENTI

296

Medicina di Laboratorio e Medicina d'Urgenza: il connubio continua  
*G. Lippi, L. Bonfanti, I. Casagrande, M. Cavazza, A. Clerico, D. Giavarina, M. Montagnana, P. Pauri, E. Rampoldi, M. Tavio, T. Trenti, G. Cervellin*

## DOCUMENTI SIBioC

305

Ridurre l'inappropriatezza in medicina di laboratorio: come, quando e perché  
*M. Plebani, G. Lippi, M. Zaninotto, M. Ciaccio*

313

La variabilità preanalitica in coagulazione  
*B. Morelli, B. Montaruli, D. Cabodi, A. Appiani, F. Bertone, V. Conterio, M. S. Demicheli, E. Muccini, C. Novelli, M. R. Portalupi, P. Pradella, S. Prestigio per il Gruppo di Studio Emostasi*

327

Interferenza da biotina negli immunodosaggi  
*G. Lippi, G. Bonetti, A. Modenese, A. Padoan, D. Giavarina per il GdS SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica*

# sommario

## LETTERE ALL'EDITORE

## CASI CLINICI

**332**

Raccomandazioni per l'implementazione del Test genetico BRCA1/2 nelle pazienti con carcinoma ovarico: dall'analisi sul tessuto tumorale a quella su DNA germinale. A cura di: Gruppo di Lavoro SIBioC Biologia Molecolare, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica-Divisione Italiana della International Academy of Pathology (SIAPEC-IAP).  
*M. Barberis, M. A. Bella, F. Buttitta, E. Capoluongo, P. Carrera, N. Colombo, L. Cortesi, M. Genuardi, M. Gion, S. Gori, V. Guarneri, N. La Verde, D. Lorusso, A. Marchetti, P. Marchetti, N. Normanno, B. Pasini, M. Pensabene, S. Pignata, P. Radice, E. Ricevuto, A. Russo, A. Sapino, P. Tagliaferri, P. Tassone, C. Trevisiol, M. Truini, L. Varesco*

**339**

Oncologia di precisione: la terminologia è importante. A cura del Gruppo di Lavoro Biologia Molecolare di SIBioC, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica- (SIAPEC), Società Italiana di Farmacologia (SIF).  
*A. Russo, L. Incorvaia, M. Truini, A. Marchetti, E. Capoluongo, M. Ciaccio, G. Castaldo, R. Danesi, M. Del Re*

**348**

Esame emocromocitometrico: telemedicina e competenze  
*S. Buoro, G. Da Rin*

**e25**

Sofferenza tubulare in un paziente con recente trapianto di rene  
*M. D'Alessandro, R. Pascone, B. Tavazzi, V. Sargentini, G. Lazzarino, L. Poli, M. Garofalo, A. Bachetoni, A. Angeloni, R. Pretagostini*

**e28**

Una malattia neurologica di difficile inquadramento  
*E. De Santis, A. Melegari, T. Trenti*

**e31**

La ricerca degli anticorpi anti-nucleo non è sempre di facile interpretazione  
*S. Silvestri, V. Falciani, A. Costantini, A. Fortunato*

save the date



51°



Congresso SIBioC  
Medicina di Laboratorio

La Medicina di Laboratorio nella fragilità e la fragilità  
della Medicina di Laboratorio  
*Laboratory Medicine in frailty and frailty of Laboratory Medicine*

PADOVA  
20-22 novembre 2019

*Padova Fiere*

un evento  
organizzato da



BIOMEDIA  
La condivisione del sapere

# biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti  
e già diretta da Carlo Franzini

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

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

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

#### Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

#### Deputy Director

Martina Zaninotto

#### Associate Editors

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

#### International Advisory Board

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

#### Editorial Secretary

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

#### Responsible Editor

Giuseppe Agosta

#### Publisher

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

#### SIBioC Executive Board 2018-2019

Fiamma Balboni  
Umberto Basile  
Sergio Bernardini *Presidente*  
Marcello Ciaccio *Past President*  
Giorgio Da Rin  
Davide Farci Santarcangeli  
Martina Montagnana  
Michele Mussap  
Antonello Nonnato  
Laura Sciacovelli  
Martina Zaninotto

#### Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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



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

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

Autorizzazione del Tribunale di Milano  
n. 40 del 2.02.1987

#### Grafica e impaginazione

Biomedica srl  
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

#### Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl  
20040 Usmate (MI)

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

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

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

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



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

## Volume 43

Numero 3 - Settembre 2019

## La determinazione dell'insulina richiede particolari attenzioni

**Andrea Mosca**

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

Era l'ottobre 1977 quando il premio Nobel per la Medicina fu assegnato ad una laureata in fisica nucleare che, circa 20 anni prima, aveva scoperto un metodo radioimmunologico per la misura di ormoni proteici. Il suo nome era Rosalyn Yalow ed il metodo che aveva messo a punto, il Radio Immuno Assay (RIA), era stato applicato alla misura dell'insulina nel sangue umano, dimostrando che nei diabetici di tipo 2 l'insulina non era in grado di esercitare il suo normale effetto fisiologico (1).

Oggi non usiamo più il metodo RIA per la misura dell'insulina e di vari altri ormoni, principalmente per il problema dello smaltimento dei rifiuti radioattivi, ma queste metodiche sono ancora presenti nei laboratori di ricerca, soprattutto per la loro elevata sensibilità e riproducibilità. Il successivo sviluppo di anticorpi monoclonali diretti contro gli epitopi della regione N-terminale della catena A e C-terminale della catena B, epitopi che sono nascosti quando il C-peptide non è stato ancora scisso, ha permesso poi di raggiungere una specificità molto alta nella determinazione dell'insulina, con una cross-reattività inferiore al 3% (2). Il problema della standardizzazione è tuttavia ancora aperto, ed è operativo in tal senso un gruppo di studio internazionale IFCC in collaborazione con l'*American Diabetes Association* (ADA) e l'*European Association for the Study of Diabetes* (EASD). Sul sito di IFCC si possono trovare ulteriori informazioni in merito (3).

In questo numero di *Biochimica Clinica*, De Liso e collaboratori riportano i risultati di uno studio sperimentale riguardo a quello che certamente è il problema pre-analitico più comune nella misura della insulina nel siero umano, cioè l'effetto dell'emolisi (4). E' noto infatti che all'interno degli eritrociti è presente insulinasì, un enzima che degrada l'insulina e che, se liberato nel plasma, può causare una significativa sottostima dei livelli di insulina inizialmente presenti. L'emolisi può capitare in fase di prelievo venoso, o può spontaneamente manifestarsi se il campione di sangue non è mantenuto ben refrigerato. Alcuni autori hanno individuato un'equazione di correzione individualizzata che, tenendo conto del grado di emolisi e del tempo di esposizione all'emolisi, permetterebbe di ottenere valori di insulina corrispondenti a quelli ottenuti sui campioni non emolizzati (5). Lo studio qui pubblicato definisce invece condizioni operative standardizzate che permettono di escludere un effetto dell'emolisi per valori di emoglobina libera plasmatica non superiori a 200 mg/dL. Riteniamo pertanto che questo studio rivesta particolare importanza per i professionisti che operano in laboratorio in quanto i risultati presentati possono avere importanti ricadute nella pratica quotidiana del laboratorio.

Ci sono almeno altre due criticità che riguardano la fase pre-analitica della misura dell'insulina, e che sono la possibile presenza di autoanticorpi anti-insulina, che si possono manifestare nella fase pre-clinica, od all'esordio del diabete di tipo 1, e la presenza di analoghi dell'insulina che potrebbero cross-reagire con i metodi immunochimici attualmente in commercio.

Ci auguriamo che la lettura del contributo di De Liso e collaboratori stimoli i lettori di questo giornale ad approfondire anche questi altri temi.

### BIBLIOGRAFIA

1. Yalow R. Radioimmunoassay: a probe for fine structure of biologic systems. Nobel Lecture, 8 December, 1977. <https://assets.nobelprize.org/uploads/2018/06/yalow-lecture.pdf> (ultimo accesso: luglio 2019)
2. Marks A, Yip C, Wilson S. Characterization of two epitopes on insulin using monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 1985;22:285-90.
3. <http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-working-groups/wg-sia/> (ultimo accesso: luglio 2019).
4. De Liso F, Madari L, De Corato P, et al. L'interferenza dell'emolisi sulla misura dell'insulina. *Biochim Clin* 2019;43:273-7.
5. Wu ZQ, Lu J, Chen H, et al. Individualized correction of insulin measurement in hemolyzed serum samples. *Immunol Res* 2017;65:605-8.

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milano, E-mail [andrea.mosca@unimi.it](mailto:andrea.mosca@unimi.it)

Ricevuto: 03.07.2019

Revisionato: 05.07.2019

Accettato: 05.07.2019

Pubblicato on-line: 17.07.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.060

## La spettrometria di massa nella diagnosi e nel monitoraggio delle gammopatie monoclonali

Paolo Milani, Giovanni Palladini

Centro per lo studio e la cura delle amiloidosi sistemiche, Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Dipartimento di Medicina Molecolare, Pavia

### ABSTRACT

**Mass spectrometry in diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies.** The identification of monoclonal components requires the use of protein electrophoresis, immunofixation electrophoresis of serum and urine and serum free light chain measurement. The combination of these three tests grants the highest diagnostic performance in different clinical settings. In clinical practice, the monoclonal protein (M-protein) is detected in a patients' serum or urine by the appearance of a distinct protein band migrating within regions typically occupied by immunoglobulins. Immunofixation or immunotyping then provides evidence that the identified protein band is an intact immunoglobulin or an immunoglobulin light chain. Taking into consideration that each M-protein is composed by a sequence of amino acids pre-defined by somatic recombination unique to each clonal plasma cell, the molecular mass of the M-protein can act as a surrogate marker of the protein composition. The Mayo Clinic researchers established mass spectrometry-based methods to assign molecular mass to the monoclonal immunoglobulin light chain and used this to detect the presence of M-proteins. The first method proposed is based on the enrichment of serum for immunoglobulins, followed by reduction to separate light chains from heavy chains, followed by microflow LC-ESI-Q-TOF mass spectrometry. The second method is based on the enrichment of nanobodies and the subsequent analysis on a matrix-assisted laser desorption mass spectrometer (MALDI). Both methods demonstrated a comparable diagnostic sensitivity to the standard procedures and could be considered as a possible future substitution of immunofixation.

### INTRODUZIONE

Le discrasie plasmacellulari sono patologie caratterizzate da un'espansione clonale delle plasmacellule (1). Tali cellule clonali sono in grado di produrre una componente monoclonale (CM) che può essere evidenziata a livello sierico od urinario. La CM è un'immunoglobulina (intera o una sua parte) secreta da un singolo clone di cellule B. Sulla base delle attuali linee guida, il riconoscimento dell'omogeneità molecolare della CM e la sua quantificazione sono permesse dalla tecnica elettroforetica, mentre l'immunofissazione o l'immunosottrazione consentono di dimostrare la natura immunoglobulinica della proteina identificata e di definire il tipo di catena pesante (ove presente) e di catena leggera che la compongono (2, 3).

Gli strumenti oggi utilizzati per la determinazione

delle CM, qualora venga posto un sospetto clinico di una discrasia plasmacellulare, sono la combinazione dell'elettroforesi del siero (sia essa con metodica capillare che su gel d'agarosio), l'immunofissazione (o l'immunosottrazione) e la misura delle catene leggere libere (FLC) circolanti. Le caratteristiche e i requisiti dei metodi tradizionali sono di seguito elencati.

- L'elettroforesi delle sieroproteine deve essere in grado di raggiungere una sensibilità diagnostica <1 g/L e il personale addetto alla refertazione deve essere espressamente formato per acquisire la capacità di una corretta ispezione visiva dei tracciati (4, 5). Tale esame è utilizzato per la ricerca delle CM sieriche, è necessario per l'inquadramento diagnostico e ha un ruolo centrale per la quantificazione e il successivo monitoraggio rispetto ai riscontri precedenti (5).

Corrispondenza a: Giovanni Palladini, Centro per lo studio e la cura delle amiloidosi sistemiche, Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Viale Golgi 19, 27100, Pavia.  
Tel 0382-502994, E-mail giovanni.palladini@unipv.it

Ricevuto: 25.02.2019

Revisionato: 15.04.2019

Accettato: 24.04.2019

Pubblicato on-line: 04.07.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.043

- L'immunofissazione deve essere effettuata obbligatoriamente al primo riscontro di una CM all'elettroforesi (2). Questo accertamento è inoltre richiesto durante il monitoraggio del paziente qualora si debba confermare la scomparsa/ricomparsa della stessa dopo trattamento specifico (5-8).
- La ricerca della proteinuria di Bence Jones urinaria deve essere eseguita tramite una immunofissazione delle urine che abbina un'elettroforesi (atta a verificare l'omogeneità molecolare della proteina) ad una tipizzazione immunologica (per verificare che la stessa sia costituita da catene leggere) (9).
- La misurazione delle FLC delle immunoglobuline nel siero è stata introdotta per la prima volta nella pratica laboratoristica nel 2001 (10) ed è oggi parte integrante dello screening, della stratificazione prognostica e della valutazione della risposta al trattamento di diverse patologie quali l'amiloidosi da catene leggere libere (AL) (7, 11, 12), il mieloma multiplo non secernente/oligosecernente (13) e per il monitoraggio della gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) (14). Attualmente oltre al metodo Freelite che è stato usato per le principali linee guida internazionali, è disponibile nei laboratori di biochimica clinica il metodo N-latex, che utilizza anticorpi monoclonali per la misura delle catene leggere libere circolanti. In un ampio studio su pazienti affetti da amiloidosi AL condotto presso il nostro centro, tali metodiche hanno dimostrato una comparabile sensibilità diagnostica. Tuttavia, non è possibile utilizzare i due metodi per il monitoraggio del medesimo paziente, essendosi dimostrati non intercambiabili (15-17). Recentemente è stato inoltre proposto un nuovo metodo per la misura delle FLC circolanti (Sebia FLC) che ha mostrato una buona concordanza clinica con il test Freelite (18).

Oltre a questi metodi in uso, la valutazione della risposta al trattamento per il mieloma multiplo si basa ora sulla ricerca della malattia minima residua, attraverso tecniche di citometria, quali la *next generation flow-cytometry (NGF)*, o di *next generation sequencing (NGS)*. Entrambi questi metodi sono entrati a far parte anche dei recenti criteri di risposta al trattamento per il mieloma multiplo (8) e sono oggetto di diversi studi in pazienti affetti da amiloidosi AL (19).

Dopo che differenti pubblicazioni hanno descritto il ruolo della spettrometria di massa per la valutazione qualitativa degli anticorpi monoclonali ad uso terapeutico (20), il gruppo della Mayo Clinic ha proposto l'applicazione di tale tecnologia alla determinazione delle CM per uso diagnostico. Scopo di questa rassegna è descrivere il ruolo della spettrometria di massa come strumento per la determinazione, la tipizzazione immunologica e il monitoraggio delle CM.

## IDENTIFICAZIONE DELLE COMPONENTI MONOCLONALI TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA CON STRUMENTO ELECTROSPRAY-IONIZATION (ESI)

L'uso della spettrometria di massa per la misurazione delle CM si basa sull'assunto che la massa molecolare delle singole proteine monoclonali possa essere utilizzata in sostituzione del pattern elettroforetico, per l'identificazione delle CM. In particolare, il riconoscimento di una singola immunoglobulina, nella sua componente costituita dalla catena pesante e dalla catena leggera, avviene tramite la sua unica sequenza aminoacidica e, pertanto, determinata massa molecolare. La massa molecolare permetterà di identificare la CM stessa anche nei successivi monitoraggi del paziente. In presenza di una proteina monoclonale, la massa molecolare della stessa, valutata con spettrometria di massa può essere distinta dal background policlonale. Per definire questo processo è stato coniato un acronimo specifico: *miRAMM (monoclonal immunoglobulin Rapid Accurate Molecular Mass)*.

Il primo metodo proposto (21, 22) è basato sull'arricchimento del siero con *Melon Gel* (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA). Il siero in esame (50 µL) deve essere diluito di 10 volte e in seguito incubato con 500 µL di gel. Dopo centrifugazione, è necessaria l'aggiunta di un agente riducente, un periodo di incubazione e un'acidificazione. Dopo tale arricchimento, il siero contenente il *Melon Gel* deve essere sottoposto all'analisi. In questo primo studio, Barnidge et al. (21) hanno utilizzato per l'analisi uno spettrometro ad alta risoluzione (ABSciex, Vaughan, ON, Canada). Gli ioni carichi sia delle catene leggere che delle catene pesanti sono convertiti nelle loro specifiche masse molecolari e la ricostruzione dell'area sotto la curva definita dal picco, che identifica la massa stessa della proteina, permette una quantificazione della proteina monoclonale identificata. Con questo metodo i ricercatori hanno per prima cosa definito la fattibilità della misurazione di immunoglobuline complete utilizzando concentrazioni note di adalimumab (anticorpo monoclonale usato a scopo terapeutico), la cui massa molecolare era dichiarata dal produttore. In seguito, è stato utilizzato il siero di un paziente affetto da mieloma multiplo che era stato seguito con controlli ripetuti presso la Mayo Clinic. In questo paziente, è stato possibile identificare la specifica massa molecolare della CM in differenti momenti del monitoraggio anche in campioni risultati negativi in elettroforesi capillare, all'immunofissazione del siero e con normale rapporto delle FLC circolanti. Barnidge et al. (21) hanno dimostrato che tramite la spettrometria di massa è possibile identificare la massa molecolare delle CM, sia delle catene leggere che delle catene pesanti. Tramite questa metodica è possibile infatti l'identificazione della proteina monoclonale come un biomarcatore specifico per il singolo paziente, che può essere seguito nel corso

di controlli successivi.

Successivamente, è stata condotta una valutazione del fenotipo policlonale delle FLC (sia kappa che lambda), e della loro distribuzione (23), mostrando come l'applicazione del metodo sopra descritto potesse essere utile per l'identificazione e la caratterizzazione delle immunoglobuline policlonali nel siero. È stata condotta un'analisi su 74 campioni di siero umano (25 caratterizzati da ipergammaglobulinemia, 24 da ipogammaglobulinemia e 25 con profilo elettroforetico nei limiti della norma). Sempre utilizzando uno spettrometro ad alta risoluzione (microLC-ESI-Q-TOF) è stata determinata la massa molecolare delle catene leggere oligoclonali, ed è stato osservato lo sfondo policlonale del siero e la distribuzione della massa delle catene leggere kappa e lambda in pazienti sani. Questo studio ha permesso di documentare le modifiche dei risultati delle analisi di spettrometria di massa in presenza di queste condizioni.

In seguito, Botz et al. (24) hanno analizzato con lo stesso metodo e strumento una serie di 157 campioni di urine, costituita da 100 campioni di urine che erano risultati positivi per la ricerca di CM tramite i metodi tradizionali (50 sono risultati positivi per catene leggere kappa e 50 per catene leggere lambda) e 57 campioni selezionati in una coorte di pazienti non precedentemente analizzati. Nell'intero gruppo, la spettrometria di massa ha identificato il 97,4% dei campioni risultati positivi all'immunofissazione. In 4 campioni solo l'immunofissazione su urine concentrate (200x) ha permesso l'identificazione di una piccola CM. Al contrario, in un paziente con elettroforesi e immunofissazione urinaria negative, la valutazione con spettrometria di massa ha documentato una CM. Sulla base di questi dati, gli autori sostengono che la spettrometria di massa ha dimostrato una sensibilità diagnostica comparabile all'immunofissazione di urine concentrate 200x. Pertanto, la spettrometria di massa potrebbe rendere possibile la ricerca di CM nelle urine senza la necessità della concentrazione, riducendo pertanto parte del lavoro in laboratorio e le possibili fonti di errore.

Dopo questi studi condotti su campioni di pazienti affetti da mieloma multiplo, una collaborazione con il nostro gruppo ha portato alla valutazione di questo metodo in 27 pazienti affetti da amiloidosi AL (25). In 23 casi è stato possibile identificare FLC monoclonali, mentre in 5 pazienti solo un alterato rapporto delle FLC circolanti era indice della presenza di una CM. In questo studio per la prima volta, oltre a confermare la buona sensibilità diagnostica anche in pazienti con piccolo clone come quelli affetti da amiloidosi AL, è stato possibile determinare la presenza di alterazioni post-traduzionali. In particolare, è stata descritta la presenza di catene leggere con anomalie di cisteinilazione o glicosilazione.

L'applicazione clinica di questo metodo è stata anche descritta in uno studio condotto su una coorte di pazienti affetti da mieloma multiplo che avevano ottenuto una

remissione ematologica completa 'stringente' dopo autotrapianto di cellule staminali emopoietiche, definita come immunofissazione del siero e delle urine negative, rapporto delle FLC circolanti nella norma e assenza di cloni plasmacellulari in biopsia midollare rilevabili mediante immunistochemica o citofluorimetria. Mills et al. (26) hanno valutato 30 pazienti e condotto l'analisi in spettrometria di massa tramite strumento ESI sia sul campione di siero prelevato al momento della diagnosi, sia su quello prelevato al momento della documentazione della risposta ematologica completa. In questa coorte, nell'81% dei soggetti era rilevabile in spettrometria di massa una CM. Pertanto, questo metodo potrebbe essere utile per la valutazione della risposta ematologica profonda nei pazienti con mieloma multiplo.

Recentemente è stato anche presentato il caso di una paziente affetta da amiloidosi AL ad interessamento cardiaco in cui non è stato possibile identificare la CM con nessuno dei metodi in uso (27). Solo l'uso della spettrometria di massa ha permesso l'identificazione di catene leggere lambda monoclonali sieriche e urinarie permettendo di valutare la risposta al trattamento.

#### **IDENTIFICAZIONE DELLE COMPONENTI MONOCLONALI TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA CON STRUMENTO *MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION* (MALDI)**

Una differente metodica utilizzata per l'identificazione, la tipizzazione e la quantificazione delle CM nel siero e nelle urine si basa sull'utilizzo di spettrometria di massa MALDI. Due studi (28, 29) condotti dal gruppo di Murray presso la Mayo Clinic hanno descritto la metodologia che si basa sull'arricchimento del siero e delle urine in esame con *nanobody*, anticorpi a singolo dominio derivati da camelidi in grado di legare in modo specifico le regioni costanti delle catene pesanti (IgG, IgA e IgM) e le regioni costanti delle catene leggere (kappa e lambda). Questi 5 differenti *nanobody* devono essere incubati con il campione in esame e subire in seguito un processo di lavaggio. A questo punto, le catene leggere sono separate dalle specifiche catene pesanti tramite incubazione con tris (2-carboxietil) fosfina (TCEPT). Il prodotto ottenuto dalla separazione è quindi posto sulla piastra del MALDI (in questo caso una piastra a 96 pozzetti, Bruker Daltonics) e preparato con una specifica matrice. Segue l'analisi tramite spettrometro MALDI-TOF (Bruker Microflex LT), in cui le componenti delle catene leggere e pesanti sono separate in multiple cariche ioniche e la distribuzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) è misurata e analizzata da un software specifico. Questa analisi è condotta in un intervallo di  $m/z$  (che corrisponde alla massa della catena leggera o pesante) tra 9000-32000 Da. L'acquisizione richiede meno di 10 secondi per ogni singola analisi. Ogni campione analizzato avrà quindi 5 differenti spettri che corrisponderanno ai cinque

*nanobody* analizzati. Questo metodo è stato definito con l'acronimo MASS-FIX.

L'identificazione e la tipizzazione della CM sono condotte tramite un'analisi ispettiva degli spettri ottenuti, con una particolare attenzione alla ricerca di possibili sovrapposizioni che permettano l'identificazione di CM complete. L'identificazione della CM è data dall'identificazione di una distribuzione anormale (non gaussiana) di un picco che è distinto dal background policlonale delle catene leggere e pesanti corrispondenti. Ogni volta che un picco anormale è identificato, l'analizzatore deve segnalare qual è il *nanobody* corrispondente e cercare se vi è una corrispondenza tra un *nanobody* di una catena pesante e di una leggera per il medesimo campione. Questa informazione è quindi tradotta nel referto di identificazione e tipizzazione della CM. L'identificazione di una proteina monoclonale richiede che siano soddisfatti i seguenti criteri: deve essere identificato un picco distinto dal background policlonale delle catene pesanti o leggere corrispondenti; il picco deve poter essere identificato in almeno due stati di carica ( $(M+1H)^{+1}$  e  $(M+2H)^{+2}$ ) e infine l'anomalia identificata deve essere ristretta ad un singolo spettro corrispondente ad una catena leggera ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) e ad una sola catena pesante (IgG, IgA o IgM). Per poter confermare che si tratti di una proteina monoclonale costituita da una immunoglobulina completa, le seguenti caratteristiche devono essere identificate: il picco anomalo deve essere presente sia per lo spettro corrispondente alla catena pesante che alla catena leggera; l'apice del picco della catena pesante e leggera devono essere sovrapposti e una simile distribuzione di tutto lo spettro della carica deve essere presente per la componente che identifica la catena pesante e la catena leggera. Ad esempio, la presenza di un picco anomalo all'analisi dello spettro del *nanobody* corrispondente alle IgG può essere associato ad una medesima anomalia del picco corrispondente al *nanobody* delle catene leggere  $\kappa$ , definendo quindi la CM del campione in esame come IgG- $\kappa$ .

Nello studio di Mills et al. (28) sono state analizzate tre differenti serie di campioni: una costituita da donatori sani (N=113); una costituita da una selezione di campioni di siero (N=407) e di urine (N=88) che hanno effettuato un'analisi per follow-up o diagnosi; la terza era costituita da 112 campioni di siero appartenenti a 40 pazienti affetti da mieloma multiplo e sottoposti a ripetuti

controlli di monitoraggio della malattia. Il metodo MASS-FIX ha mostrato una sensibilità diagnostica sovrapponibile all'immunofissazione. Inoltre, in una coorte di 174 sieri di pazienti con CM misurabili alla valutazione elettroforetica è stato possibile eseguire la quantificazione della proteina con metodica MASS-FIX. Per ottenere tale dato è richiesto un programma informatico specifico che permette la misura dell'area sotto il picco m/z, che identifica la componente stessa alla valutazione MASS-FIX. Tale studio ha permesso di stabilire che MASS-FIX era in grado di fornire informazioni riguardo la quantificazione delle CM, sovrapponibili rispetto all'elettroforesi capillare indicate da una correlazione per la misura di componenti IgG con  $R^2=0.94$ , per le componenti IgA  $R^2=0.84$  e per le IgM  $R^2=0.84$  (28).

Nello studio condotto da Kohlhagen et al. (29) sono stati studiati 556 sieri provenienti da pazienti valutati per la ricerca di CM. In questo studio è stata condotta un'analisi di soli spettri per le catene leggere  $\kappa$  e  $\lambda$ , sono stati definiti gli intervalli di riferimento dell'intervallo m/z ed è stata comparata la sensibilità diagnostica di MASS-FIX con l'elettroforesi del siero e gli altri metodi in uso. La spettrometria di massa ha dimostrato di essere in grado di sostituire l'elettroforesi del siero per l'identificazione delle CM ma che, il 28% dei campioni risultati negativi all'analisi MASS-FIX, presentavano un'anormalità del rapporto  $\kappa/\lambda$  delle FLC circolanti misurate con metodo *Freelite*. Pertanto, la combinazione dei due metodi (MASS-FIX e la misurazione delle FLC circolanti) potrebbe permettere di ottenere la massima sensibilità diagnostica (Tabella 1).

Due limitazioni degli studi descritti sopra erano l'assenza di una correlazione clinica dei risultati ottenuti e la mancanza di una valutazione combinata in campioni di siero e di urine del medesimo paziente. Pertanto, è stato condotto uno studio che mettesse in correlazione i risultati dell'analisi MASS-FIX con le specifiche diagnosi cliniche dei pazienti in 257 campioni appaiati di siero e urine (30). I soggetti eleggibili per lo studio dovevano avere effettuato nel medesimo giorno tutti gli accertamenti disponibili per la ricerca delle CM (elettroforesi e immunofissazione di siero e di urine e misurazione delle FLC circolanti). Tutti i campioni sono quindi stati sottoposti ad analisi MASS-FIX e solo in sei casi la combinazione immunofissazione del siero e misura delle FLC ha documentato una CM non

**Tabella 1**

*Sensibilità diagnostica del test MASS-FIX rispetto a elettroforesi ed immunofissazione in una coorte di 556 sieri analizzati (modificata dal riferimento 28)*

	MASS-FIX positivo	MASS-FIX negativo
Elettroforesi positiva	257	0
Immunofissazione positiva	149	15
Immunofissazione negativa	25	110

determinabile con MASS-FIX del siero ma solo uno di questi è risultato negativo anche all'analisi MASS-FIX delle urine. In aggiunta, 18 campioni sono risultati positivi all'analisi MASS-FIX ma non allo studio con le metodiche tradizionali. Questa analisi è stata condotta suddividendo la popolazione in studio in diversi gruppi a seconda della diagnosi clinica e secondo il momento della storia clinica del singolo paziente (alla diagnosi, al momento della valutazione della risposta alla terapia). La sensibilità diagnostica della combinazione MASS-FIX in siero e urine è risultata sovrapponibile a quella della delle combinazioni dei metodi in uso in tutti i sottogruppi analizzati (Tabella 2).

Oltre ad un'analisi di sensibilità, un'importante dato emerso dall'analisi dei campioni combinati di siero e urine è stato il fatto che il rapporto m/z delle CM a livello sierico non ha mostrato una differenza significativa rispetto al dato urinario. Inoltre, dall'analisi ispettiva degli spettri di CM di circa il 50% dei pazienti affetti da amiloidosi AL, è emersa la presenza di una possibile anomalia post-traduzionale. Questi spettri 'anomali' sono quindi stati oggetto di una seconda analisi con metodica di spettrometria di massa ESI, che ha documentato la possibile presenza di glicosilazione (30) (Figura 1).

Sulla base del riscontro di una maggiore frequenza di anomalie post-traduzionali in pazienti affetti da amiloidosi AL, sono stati condotti due successivi studi (31, 32). Nel primo studio, Kumar et al. (31) hanno mostrato che circa un terzo dei pazienti affetti da amiloidosi AL e CM kappa presentava una glicosilazione delle catene leggere. Tale riscontro era tre volte più probabile nelle catene leggere di tipo kappa rispetto ai pazienti affetti da amiloidosi AL con clone lambda. Il successivo studio di Kourelis et al. (32) ha mostrato che era possibile identificare la presenza di anomalie a livello dello spettro m/z ad analisi MASS-FIX anche al momento della prima identificazione della CM, prima del riscontro di depositi di amiloide. Infatti, in 11 casi di pazienti con catene leggere glicosilate, questa anomalia era stata riscontrata alla prima valutazione al momento

dell'identificazione della gammapatia monoclonale, prima dell'insorgenza di amiloidosi. Pertanto, tale riscontro potrebbe essere utile per procedere ad un inquadramento più accurato del paziente al fine di accertare la possibile presenza di segni precoci di danno d'organo compatibili con amiloidosi.

## CONCLUSIONE

L'uso della spettrometria di massa per l'identificazione, la tipizzazione e la quantificazione delle CM è possibile e ha dimostrato in diversi studi una sensibilità diagnostica paragonabile a quella dell'immunofissazione. I vantaggi dell'introduzione di questo metodo nella pratica del Laboratorio di Biochimica Clinica di questo metodo sono molteplici.

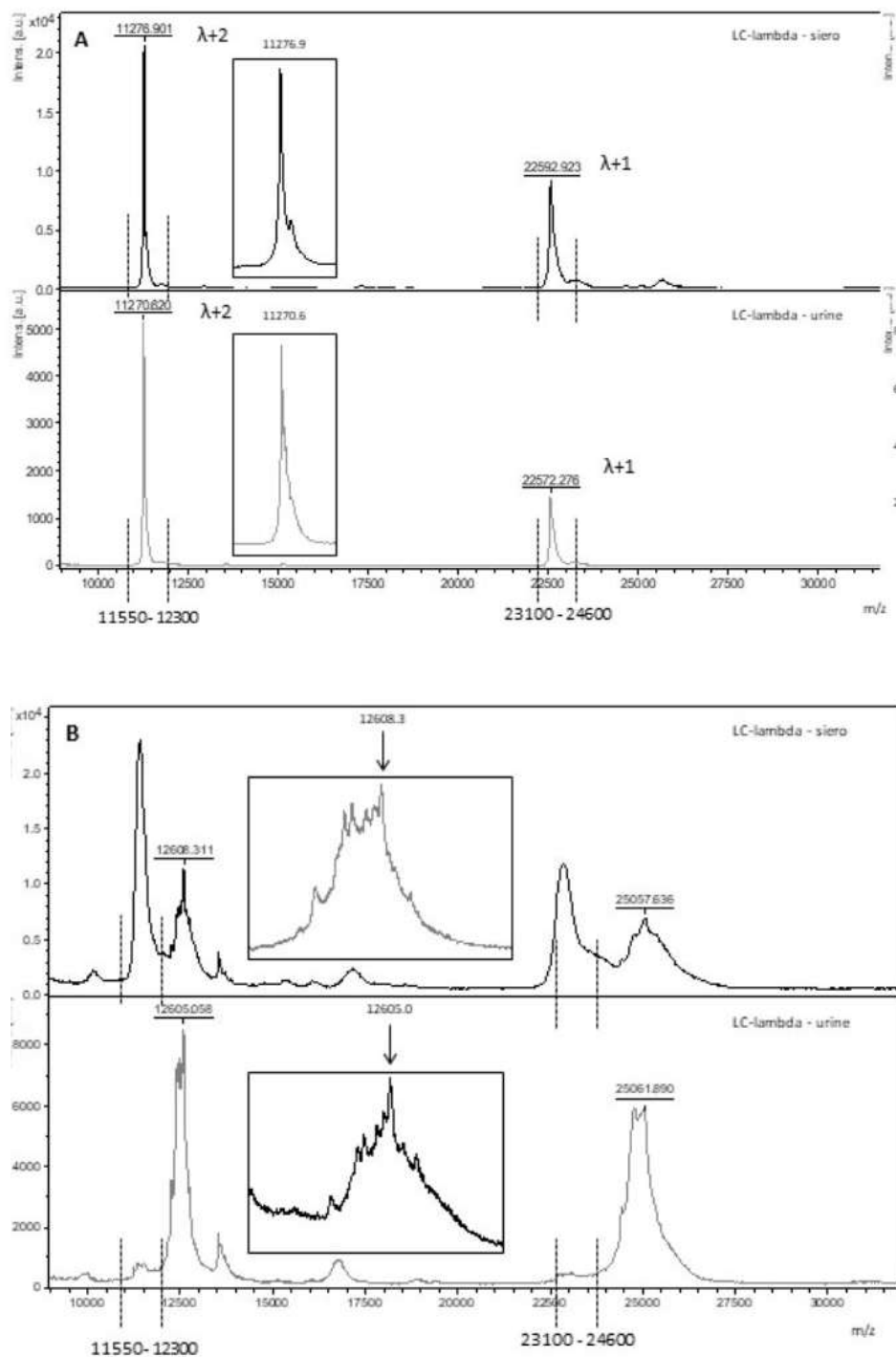
- La componente monoclonale è identificata tramite la definizione della specifica massa molecolare della proteina. Pertanto, per ogni singolo paziente potrà essere possibile definire la massa molecolare della sua CM. Tale riscontro potrebbe permettere di seguire nel tempo l'andamento della componente e verificare con certezza, in caso di recidiva, la ricomparsa della componente dell'esordio o di una nuova immunoglobulina monoclonale. Questo potrebbe essere particolarmente rilevante in pazienti trattati con terapie che possono interferire con l'individuazione delle CM coi metodi tradizionali, come l'autotrapianto di cellule staminali, che può essere seguito dalla comparsa di oligoclonalità o l'uso di anticorpi monoclonali. In particolare, Zajec et al. (33) hanno proposto una metodica di valutazione che permette la distinzione di alcuni dei principali anticorpi monoclonali usati in ambito terapeutico tramite la spettrometria di massa.
- Il tempo di acquisizione tramite MASS-FIX è di circa 20 minuti per 96 pazienti. Questo risultato è nettamente inferiore ai tempi di preparazione ed esecuzione della combinazione elettroforesi e immunofissazione. Inoltre, la sensibilità diagnostica dell'analisi MALDI su campioni di urine non

**Tabella 2**

*Sensibilità diagnostica in 257 campioni appaiati di siero ed urine (modificata dal riferimento 30)*

Diagnosi	Almeno uno dei test diagnostici positivi	MASS-FIX siero o urine positivo
Mieloma multiplo	83 (23)	84 (23)
Amiloidosi AL	50 (25)	59 (26)
MGUS	58 (58)	57 (57)
Altre discrasie plasmacellulari	12 (5)	12 (5)
Altre malattie	1	7
Totale	204 (111)	219 (111)

*Amiloidosi AL, amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche; MGUS, gammapatia monoclonale di significato indeterminato; altre discrasie plasmacellulari: macroglobulinemia di Waldenstrom, POEMS syndrome, glomerulopatia fibrillare, crioglobulinemia; altre malattie: insufficienza renale, pazienti con sospetta amiloidosi AL non confermata, pazienti con forme di amiloidosi non-AL. I numeri tra parentesi indicano i campioni che appartenevano a pazienti valutati al momento della diagnosi della malattia.*



**Figura 1**

(Modificata dal riferimento 30)

Pannello A: spettro che rappresenta il risultato di un'analisi MASS-FIX di un paziente affetto da mileoma multiplo, dove è stato possibile riscontrare una componente monoclonale sierica (parte superiore) ed urinaria (parte inferiore) costituita da catene leggere lambda. L'insero permette di meglio osservare la rappresentazione tipica del picco stretto che identifica una componente monoclonale. Pannello B. Spettro che rappresenta il risultato di un'analisi MASS-FIX di un paziente affetto da amiloidosi AL, dove è stato possibile riscontrare una componente monoclonale sierica (parte superiore) ed urinaria (parte inferiore) costituita da catene leggere lambda. L'insero permette di meglio osservare la rappresentazione di uno spettro 'atipico' del picco che identifica la componente monoclonale. In entrambi i pannelli, le linee tratteggiate indicano gli intervalli della scala massa/carica (m/z) dove è attesa l'identificazione di una componente monoclonale, sia sierica che urinaria. È possibile notare che lo spettro atipico è localizzato al di fuori dell'intervallo atteso.

concentrate è risultata comparabile all'immunofissazione su urine concentrate. La possibilità di escludere questo passaggio può ulteriormente ridurre i tempi di refertazione delle analisi urinarie ed essere un chiaro vantaggio, soprattutto nei laboratori con un alto numero di analisi giornaliere. L'automazione del processo di preparazione del campione per l'analisi in spettrometria di massa potrà essere associata ad un'ulteriore riduzione dei tempi per l'esame con MALDI e rappresenta un chiaro vantaggio rispetto alle metodiche attualmente in uso.

- La metodica di separazione delle immunoglobuline tramite *nanobody* specifici limita in modo significativo la possibile interferenza nella quantificazione delle CM. È noto infatti che, l'attuale metodica di quantificazione tramite elettroforesi del siero subisce l'interferenza di fibrinogeno e delle proteine della zona beta (qualora la componente non migri in regione gamma). Pertanto, in particolare per pazienti con componenti IgA, o con piccole componenti difficili da distinguere dal background policlonale, la metodica MASS-FIX di quantificazione potrebbe dimostrarsi un più valido approccio rispetto a quella ora in uso.
- Lo studio tramite MASS-FIX ha permesso il riscontro di possibili anomalie post-traduzionali in pazienti con amiloidosi AL. Questo potrebbe essere un utile strumento per un'identificazione precoce di pazienti ad alto rischio di sviluppare la malattia (se identificati nello stadio di MGUS o mieloma multiplo asintomatico). Il ruolo patogenetico della presenza di anomalie post-traduzionali nella formazione delle fibrille di amiloide non è tuttora stato del tutto chiarito. Tuttavia, la netta presenza di una maggiore propensione di questa alterazione nel sottogruppo di pazienti affetti da amiloidosi AL, suggerisce il possibile coinvolgimento di questa nel favorire l'instabilità della proteina e la sua propensione all'aggregazione. Questi dati richiedono una futura validazione prospettica su un più alto numero di pazienti, che potrebbe essere ottenuta dopo un'introduzione su più larga scala della metodica.

Le possibili limitazioni sono le seguenti. L'utilizzo di spettrometria di massa secondo metodica ad alta risoluzione (micro LC-ESI-Q-TOF) richiede personale dedicato con alta formazione, sia per il processo di analisi che poi per l'interpretazione dei risultati; Al momento gli studi in corso hanno documentato una sensibilità diagnostica che è sovrapponibile alla combinazione dei diversi metodi in uso. In particolare, non è stata documentata con i *nanobody* sino ad ora utilizzati una maggiore sensibilità diagnostica. I prossimi studi dovranno valutare la capacità di questi nuovi strumenti con i metodi usati per la ricerca della malattia minima residua documentata a livello midollare (8); saranno necessari studi clinici per definire nuovi criteri di stadiazione e di risposta basati sulla spettrometria di massa. Fino ad allora, i criteri di risposta attuali non potranno essere applicati.

In conclusione, l'applicazione della spettrometria di massa alla diagnostica proteica rappresenta una valida opzione che dovrà essere attentamente valutata nel prossimo futuro. Saranno necessari studi su un numero maggiore di pazienti, in differenti ambiti clinici e valutazioni prospettiche per arrivare a definire la possibile sostituzione dell'attuale approccio alla diagnostica proteica con questa metodica.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Oncology (Williston Park)* 2011;25:578-86.
2. Caldini A, Graziani M, Basile U. et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2013;38:47-53.
3. Vernocchi A, Dolci, A. per il Gruppo di Studio Proteine di SIBioC Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:199-207.
4. Tate J, Caldwell G, Daly J et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49:242-56.
5. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
6. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
7. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012;30:4541-9.
8. Kumar S, Paiva B, Anderson KC et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17:e328-e46.
9. Graziani M, Merlini, G, Petrini, C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2001;25:23-32.
10. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine *Clin Chem* 2001;47:673-80.
11. Milani P, Basset M, Russo F et al. Patients with light-chain amyloidosis and low free light-chain burden have distinct clinical features and outcome. *Blood* 2017;130:625-31.
12. Dittich T, Bochtler T, Kimmich C et al. AL amyloidosis patients with low amyloidogenic free light chain levels at first diagnosis have an excellent prognosis. *Blood* 2017;130:632-42.
13. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A et al. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 2013;27:941-6.
14. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem*

- 2009;55:1517-22.
15. Palladini G, Jaccard A, Milani P et al. Circulating free light chain measurement in the diagnosis, prognostic assessment and evaluation of response of AL amyloidosis: comparison of Freelite and N latex FLC assays. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1734-43.
  16. Jacobs JF, Hoedemakers RM, Teunissen E et al. Effect of sample dilution on two free light chain nephelometric assays. *Clin Chim Acta* 2012;413:1708-9.
  17. Schneider N, Wynckel A, Kolb B et al. Comparative analysis of immunoglobulin free light chains quantification by Freelite (The Binding Site) and N Latex FLC (Siemens) methods. *Ann Biol Clin (Paris)* 2013;71:13-9.
  18. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers H et al. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:312-22.
  19. Milani P, Merlini G, Palladini G. What does minimal residual disease mean in AL amyloidosis? *Expert Opin Orphan Drugs* 2018;6:703-5.
  20. Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev* 2009;28:147-76.
  21. Barnidge DR, Dasari S, Botz CM et al. Using mass spectrometry to monitor monoclonal immunoglobulins in patients with a monoclonal gammopathy. *J Proteome Res* 2014;13:1419-27.
  22. Barnidge DR, Tschumper RC, Theis JD et al. Monitoring M-proteins in patients with multiple myeloma using heavy-chain variable region clonotypic peptides and LC-MS/MS. *J Proteome Res* 2014;13:1905-10.
  23. Barnidge DR, Dasari S, Ramirez-Alvarado M et al. Phenotyping polyclonal kappa and lambda light chain molecular mass distributions in patient serum using mass spectrometry. *J Proteome Res* 2014;13:5198-205.
  24. Botz CM, Barnidge DR, Murray DL et al. Detecting monoclonal light chains in urine: microLC-ESI-Q-TOF mass spectrometry compared to immunofixation electrophoresis. *Br J Haematol* 2014;167:437-8.
  25. Barnidge DR, Dispenzieri A, Merlini G et al. Monitoring free light chains in serum using mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1073-83.
  26. Mills JR, Barnidge DR, Dispenzieri A et al. High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2017;7:e590.
  27. Saadalla AM, Singh A, Barnidge D et al. High sensitivity M-protein detection in a case of light-chain cardiac amyloidosis without evidence of plasma cell dyscrasia. *Am J Hematol* 2019;94:619-21.
  28. Mills JR, Kohlhagen MC, Dasari S et al. Comprehensive assessment of m-proteins using nanobody enrichment coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem* 2016;62:1334-44.
  29. Kohlhagen MC, Barnidge DR, Mills JR et al. Screening method for M-Proteins in serum using nanobody enrichment coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem* 2016;62:1345-62.
  30. Milani P, Murray DL, Barnidge DR et al. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol* 2017;92:772-9.
  31. Kumar S, Murray D, Dasari S et al. Assay to rapidly screen for immunoglobulin light chain glycosylation: a potential path to earlier AL diagnosis for a subset of patients. *Leukemia* 2019;33:254-7.
  32. Kourelis T, Murray DL, Dasari S et al. MASS-FIX may allow identification of patients at risk for light chain amyloidosis before the onset of symptoms. *Am J Hematol* 2018;93:e368-e70.
  33. Zajec M, Jacobs JFM, Groenen P et al. Development of a targeted mass-spectrometry serum assay to quantify m-protein in the presence of therapeutic monoclonal antibodies. *J Proteome Res* 2018;17:1326-33.

## La diagnostica di laboratorio nella sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi

Elisa Danese<sup>1</sup>, Davide Negrini<sup>1,2</sup>, Gian Luca Salvagno<sup>1</sup>, Chiara Zaltron<sup>3</sup>, Oliviero Olivieri<sup>3</sup>, Giuseppe Lippi<sup>1</sup>, Francesca Pizzolo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli studi di Verona

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera e Università di Padova

<sup>3</sup>Medicina Interna, Dipartimento di Medicina, Università degli studi di Verona

### ABSTRACT

**The laboratory diagnosis of apparent mineralocorticoid excess (AME).** The apparent mineralocorticoid excess (AME) is a rare genetic disorder caused by impaired activity of the enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ HSD2). This abnormality is associated with cortisol excess and abnormal activation of mineralocorticoid receptor, which is usually only activated by aldosterone. More than 50 known mutations have been associated with AME; whilst some epigenetic modifications may also be involved. AME causes severe hypertension and is hence traditionally diagnosed during the first years of life. Deficit of 11 $\beta$ HSD2 also occur in other physiopathological conditions like pre-eclampsia, sodium-sensitive hypertension and kidney or hepatic impairment. The biochemical diagnosis is conventionally made by quantifying tetrahydroxylated metabolites of cortisol (THF and allo-THF) and cortisone (THE) expressed as THF+allo-THF/THE ratio and using home-made Gas Chromatography-Mass Spectrometry methods. Nevertheless, some recent studies showed more accurate characterization of 11 $\beta$ HSD2 deficit by measuring the urinary free cortisol/cortisone ratio with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. A final consensus on the preferred method to diagnose AME has not been reached so far, and more studies are needed for better defining sensitivity and specificity of these tests in some different physiopathological conditions associated with 11 $\beta$ HSD2 impairment.

### INTRODUZIONE

La sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi (AME) è un raro disordine autosomico recessivo imputabile ad una ridotta attività dell'enzima 11 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2 (11 $\beta$ HSD2) (1). Questo enzima, codificato dal gene *HSD11B2*, metabolizza il cortisolo in cortisone, suo precursore metabolico inerte. Mutazioni del gene *HSD11B2* influenzano l'attività dell'enzima, generando un eccesso di cortisolo, che si lega però al recettore mineralcorticoidi (normalmente attivato solo dall'aldosterone), causandone un'inappropriata e abnorme attivazione. Da un punto di vista biochimico, la diagnosi di AME è molto complessa, sia perché i metodi attualmente in uso nei laboratori clinici sono scarsamente standardizzati, sia perché non è ancora stato stabilito quale sia il marcatore biochimico ideale.

### L'ENZIMA 11BETA-IDROSSISTEROIDE DEIDROGENASI

L'enzima 11 $\beta$ HSD è un enzima presente in due isoforme, ciascuna caratterizzata da una diversa distribuzione tissutale. L'isoenzima di tipo 1 (che media la conversione del cortisone in cortisolo) è un enzima NADP-dipendente ad attività reduttasica. È distribuito in una grande varietà di tessuti, ma lo si trova principalmente espresso nel fegato e nel tessuto adiposo. L'isoenzima di tipo 2 (che media la trasformazione di cortisolo in cortisone) è un enzima NAD-dipendente ad attività deidrogenasica. È una proteina di 405 aminoacidi, presenta solo il 14% di omologia con l'isoforma 1 ed è espresso solo in alcuni tessuti, in particolare nel rene (a livello dei dotti collettori corticali), colon, ghiandole sudoripare e placenta (2).

Nella reazione di conversione da cortisolo in cortisone catalizzata dall'enzima 11 $\beta$ HSD2 si ha la

Corrispondenza a: Elisa Danese, Sezione di Biochimica Clinica, Policlinico GB Rossi, P.Le LA Scuro 10, 37131, Verona  
Tel 039 045 812 6698, E-mail elisa.danese@univr.it

Ricevuto: 08.04.2019

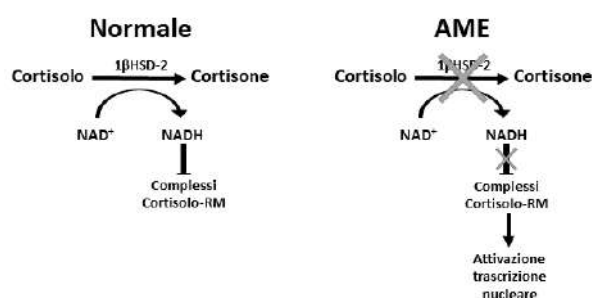
Revisionato: 13.05.2019

Accettato: 20.05.2019

Pubblicato on-line: 04.07.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.050

contemporanea produzione di una molecola di NADH. Considerando che circa il 90% dei recettori dei mineralcorticoidi renali (RM) sono normalmente occupati ma non attivati dal cortisolo, è probabile (anche se ancora da stabilire sperimentalmente) che normalmente questi complessi cortisolo-RM siano mantenuti inattivi grazie al NADH co-generato, così come analogamente avviene per altri fattori di trascrizione nucleare (3). Quando l'11 $\beta$ HSD2 è scarsamente espresso, o la sua attività compromessa, i livelli di NADH diminuiscono, consentendo ai complessi cortisolo-RM di attivare la trascrizione indotta dal RM, con effetti analoghi a quelli dell'aldosterone (Figura 1) (1).



**Figura 1**

Rappresentazione schematica del ruolo del NADH nella sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi (AME)

Analogamente a quanto avviene per altri fattori di trascrizione nucleare, si ipotizza che il NADH prodotto dalla reazione catalizzata dall'enzima 11 $\beta$ HSD2 vada a bloccare l'azione di attivazione della trascrizione nucleare dei complessi cortisolo-mineralcorticoidi renali (RM) (1, 3).

Deficit di attività enzimatica più o meno severi si riscontrano nell'AME come anche in altre condizioni fisiopatologiche, quali preeclampsia, insufficienza renale o epatica e ipertensione sodio-sensibile. Inoltre, deficit parziali possono anche essere indotti dall'assunzione di glicirrizina, composto presente naturalmente nella liquirizia (4).

## SINDROME DA APPARENTE ECCESSO DI MINERALCORTICOIDI (AME)

L'AME è una sindrome ad ereditarietà autosomica recessiva, caratterizzata da un esordio precoce associato ad ipertensione grave. La prevalenza è difficile da stimare poiché varia considerevolmente nelle varie popolazioni in funzione del grado di consanguineità (1). Fatta eccezione per le famiglie in cui la malattia è stata già diagnosticata, e si è quindi eseguita una diagnostica prenatale, l'AME conclamata è di solito diagnosticata nel corso del primo anno di vita. È caratterizzata da poliuria e polidipsia, ritardo di crescita, grave ipertensione con bassi livelli di renina e aldosterone, ipokaliemia grave con alcalosi metabolica, e molto spesso nefrocalinosi. Nella sua forma più severa, l'AME di tipo 1, si ha la completa perdita dell'attività dell'enzima 11 $\beta$ HSD2, mentre nella forma di tipo 2 la perdita è solo parziale. Il gene che codifica per l'enzima si trova sul braccio lungo del cromosoma 16 (16q22) ed è costituito da 5 esoni e 4

introni. Ad oggi sono state identificate più di 50 mutazioni responsabili della malattia (4-7). L'AME di tipo 1 è causata da mutazioni puntiformi, mentre la forma meno severa può essere causata da polimorfismi. Recentemente è stato inoltre proposto che, accanto a queste mutazioni genetiche, vi siano modificazioni epigenetiche, soprattutto a carico del promotore del gene, in grado di influenzare l'espressione genica e quindi condizionare l'attività enzimatica. Tra queste, la metilazione del promotore del gene sembra essere il principale meccanismo epigenetico in grado di influenzare l'espressione genica. Nello specifico, un'aumentata metilazione del promotore si associa a riduzione dell'espressione genica. Agalou et al. hanno supportato questa ipotesi, riportando che i livelli circolanti di mRNA per il gene dell'11 $\beta$ HSD2 sono significativamente più alti nei soggetti normotesi rispetto agli ipertesi (8). Friso et al. hanno anche dimostrato come elevati livelli di metilazione nel promotore del gene 11 $\beta$ HSD2 si associano ad ipertensione arteriosa nei soggetti trattati con glucocorticoidi (9).

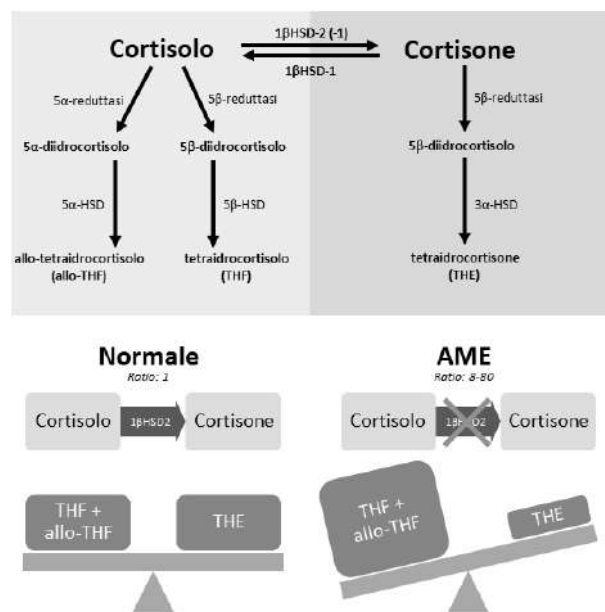
In condizioni fisiologiche, l'aldosterone si lega al RM nei tessuti bersaglio. In vitro, questi recettori presentano la stessa affinità di legame sia per i mineralcorticoidi (aldosterone) sia per i glucocorticoidi (cortisolo), mentre in vivo i RM esprimono maggiore specificità di legame per l'aldosterone, nonostante il cortisolo raggiunga concentrazioni plasmatiche da 100 a 1000 volte maggiori rispetto al mineralcorticoide. Questa specificità di legame è resa possibile dalla presenza dell'enzima 11 $\beta$ HSD2 nei tessuti bersaglio, il quale converte il cortisolo nella sua forma biologicamente inattiva (il cortisone), incapace di legarsi al RM e di esprimere quindi attività mineralcorticoide. Nell'AME il deficit di attività dell'enzima 11 $\beta$ HSD si traduce in inefficiente trasformazione di cortisolo in cortisone. Il cortisolo si lega quindi al RM, aumenta la trascrizione dei geni target che inducono up-regolazione del canale epiteliale apicale del sodio (ENaC) e della pompa basolaterale (Na/K ATPasi). Ne consegue un cospicuo aumento del riassorbimento di sodio da parte del rene e una eccessiva escrezione di potassio nelle urine. Nonostante la mancata conversione di cortisolo a cortisone, i pazienti con AME non presentano un fenotipo simil-Cushing. A fronte di un ridotto metabolismo del cortisolo, infatti, la presenza di un efficiente meccanismo a feedback negativo causa una diminuzione di secrezione endogena di cortisolo, cui conseguono valori normali di cortisolo circolante (10).

Nella valutazione clinica della sindrome da AME la concentrazione plasmatica di aldosterone non è aumentata nel sangue poiché il sistema renina-angiotensina-aldosterone è correttamente regolato, e l'espansione volemica indotta dall'attivazione da parte del cortisolo del RM induce una inibizione dell'attivazione del suddetto sistema. La principale indicazione all'indagine biochimica è quindi il riscontro di ipertensione essenziale accompagnata da bassi valori di aldosterone, renina e potassio. L'approccio più semplice per confermare la diagnosi consiste nella valutazione del

bilanciamento fra i metaboliti urinari del cortisolo e del cortisone, la cui concentrazione urinaria dipende in modo sostanziale dall'attività dell'enzima in questione.

## RUOLO DEL LABORATORIO NELLA DIAGNOSI DI AME

Tradizionalmente la diagnosi di deficit dell'enzima  $11\beta$ HSD2 è effettuata misurando i metaboliti tetraidrossilati di cortisolo e cortisone nelle urine. Questi metaboliti sono il tetraidrocortisolo (THF) e l'allo-tetraidrocortisolo (allo-THF) di derivazione dal cortisolo e il tetraidrocortisone (THE) di derivazione dal cortisone. Entrambi si formano a seguito dell'intervento di una reductasi e di una deidrogenasi. Nel paziente normale entrambe le isoforme enzimatiche responsabili dell'equilibrio cortisolo-cortisone funzionano correttamente così che il rapporto THFs/THE è prossimo a 1:1. Nel paziente con deficit di  $11\beta$ HSD2 il rapporto si sposta a favore dei metaboliti del cortisolo (Figura 2). La tecnica di elezione per queste determinazioni è la gascromatografia (GC) accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS), tecnica complessa e non comunemente disponibile nei laboratori clinici.



**Figura 2**

Rappresentazione schematica dell'attività enzimatica coinvolta nel metabolismo dei glucocorticoidi.

L'interconversione tra cortisolo e cortisone avviene per mezzo delle due isoforme dell'enzima  $11\beta$ HSD. Nel fegato, la  $5\alpha$  e  $5\beta$ -reduttasi e  $3\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi ( $3\alpha$ -HSD) convertono il cortisolo in  $5\alpha$ -tetraidrocortisolo (allo-THF) e  $5\beta$ -tetraidrocortisolo (THF) e convertono il cortisone in tetraidrocortisone (THE). Nel soggetto normale l'escrezione urinaria dei metaboliti tetraidrossilati di cortisolo e cortisone sono bilanciati per cui il rapporto (THF+alloTHF)/THE è circa 1. Nel soggetto con AME, invece, si ha uno sbilanciamento di tale rapporto a favore dei metaboliti tetraidrossilati del cortisolo che risulta in un rapporto (THF+alloTHF)/THE generalmente compreso tra 8 e 80. Modificata dal riferimento 32.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati alcuni lavori nei quali si è dimostrato come la misurazione del rapporto cortisolo-cortisone rappresenti un indice più accurato del deficit dell'isoforma 2, e sia quindi da preferire alla quantificazione di THFs e THE nella diagnosi biochimica di AME. Nei soggetti sani il cortisone ha una concentrazione urinaria di quasi due volte superiore a quella del cortisolo, per effetto proprio dell'attività dell' $11\beta$ HSD2 renale. Nei pazienti con AME, invece, il cortisone è virtualmente non quantificabile nelle urine. Diversamente dai metaboliti tetraidrossilati, il cortisolo libero urinario e il cortisone libero urinario sono facilmente quantificabili con metodi ormai standardizzati, mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS) (11).

Gli studi in letteratura che hanno confrontato l'efficacia diagnostica di cortisolo e cortisone e dei rispettivi metaboliti tetraidrossilati nell'identificazione dei deficit di  $11\beta$ HSD2 non sono molti. Palermo et al. sono stati i primi a suggerire che la misura del rapporto cortisolo/cortisone libero urinario (UFF/UFE) fosse un indice accurato dell'attività enzimatica di  $11\beta$ HSD2 a livello renale (12). Diversamente, il rapporto THFs/THE fornirebbe un indice dell'attività totale dell'enzima  $11\beta$ HSD, e in particolare dell'attività dell'isoforma 1 nel fegato e dell'isoforma 2 nel rene. In uno studio del 1996, Palermo et al. hanno effettuato la determinazione di entrambe le coppie di analiti nelle urine delle 24 ore raccolte da 41 soggetti adulti sani, 12 bambini di età inferiore ai 12 anni anch'essi sani, 15 pazienti con sindrome di Cushing, 12 pazienti con ipopituitarismo in terapia sostitutiva con idrocortisone, 12 pazienti con AME e 7 volontari sani che avevano assunto liquirizia (componente attivo glicirizzina alla dose di 240 mg al giorno per 45 giorni). Tutte le determinazioni sono state eseguite in GC-MS. I principali risultati sono stati i seguenti: nei soggetti sani, adulti e bambini, i livelli di cortisone libero urinario eccedevano quelli di cortisolo libero urinario (UFF/UFE:  $0,54\pm 0,05$ ); diversamente, i metaboliti tetraidrossilati di cortisone e cortisolo mostravano un rapporto invertito (THFs/THE:  $1,21\pm 0,06$ ). Il cortisolo era elevato nei pazienti con sindrome di Cushing, diminuito nei pazienti con ipopituitarismo in terapia sostitutiva, nei pazienti con AME di tipo 2 e nei soggetti che avevano fatto uso di liquirizia, e infine indosabile nei pazienti con AME di tipo 1. Inoltre, in tutte le classi di pazienti con difetto enzimatico, il rapporto UFF/UFE era molto più alterato del rapporto THFs/THE, rivelandosi quindi indice molto più sensibile dell'attività di  $11\beta$ HSD2 a livello renale (12).

Un anno dopo, Best et al. hanno valutato l'utilità della determinazione di cortisolo e cortisone e dei loro metaboliti nelle urine in due gruppi di volontari sani, ai quali erano stati somministrati inibitori delle due isoforme di  $11\beta$ HSD. I due gruppi (entrambi costituiti da tre uomini adulti) erano stati sottoposti ad un regime dietetico di 150 mmol di Na<sup>+</sup> al giorno e 80 mmol di K<sup>+</sup> al giorno per 5 giorni, fino al raggiungimento del bilancio salino.

Dopodiché, ad un gruppo sono stati somministrati 170 mg di acido glicirrizico per tre volte al giorno per due giorni (onde inibire efficacemente l'enzima 11 $\beta$ HSD2) e all'altro invece sono stati somministrati 100 mg di carbenoxolone per tre volte al giorno per due giorni (inibitore di 11 $\beta$ HSD1 e 11 $\beta$ HSD2). Infine, i due gruppi hanno assunto entrambi i principi attivi per ulteriori tre giorni. Analogamente a quanto dimostrato nello studio precedente, gli autori hanno concluso che il rapporto UFF/UFE sembra rappresentare l'indice più sensibile dell'attività renale dell'enzima 11 $\beta$ HSD2 (13).

Nel 2001 Ferrari et al. hanno eseguito le stesse determinazioni in soggetti sani dopo somministrazione di 30 o 180 mmol di sale al giorno o acido glicirrizico alla dose di 500 mg al giorno per sette giorni. Gli autori hanno dimostrato che questa quantità era efficace a provocare un significativo effetto mineralcorticoide, come dimostrato dall'aumento della pressione arteriosa e dei valori di sodiemia, dalla diminuzione dei valori di potassiemia, di renina plasmatica e aldosterone, e dal ridotto rapporto aldosterone/potassio nelle urine. In risposta a queste somministrazioni gli autori hanno riscontrato che l'aumento del rapporto THFs/THE (ma non di UFF/UFE) era maggiore nei soggetti sale-sensibili rispetto a quelli sale-resistenti, e correlava inoltre con le alterazioni pressorie. La variabilità intra-individuale è stata anche minore per i metaboliti tetraidrossilati che per UFF e UFE. Diversamente dagli studi precedenti, il rapporto UFF/UFE non si è dimostrato un indice più sensibile di ridotta attività enzimatica di 11 $\beta$ HSD2. Infine, il rapporto THF/THE ha discriminato meglio i soggetti sodio-sensibili rispetto ai sodio-resistenti (14).

Nonostante i risultati contrastanti originati da questi tre studi chiave, e la conseguente mancanza di consenso in letteratura sull'esame biochimico di scelta nell'ambito dei deficit di 11 $\beta$ HSD2, un numero sempre più crescente di studi scientifici si è orientato verso la determinazione di UFF e UFE in alternativa a THFs e THE, riportando buone/ottime prestazioni diagnostiche nell'ambito dell'ipertensione essenziale (15-19). Contemporaneamente sono stati pubblicati numerosi studi che riportano la messa a punto e validazione di nuovi metodi in LC-MS/MS per la misura di questi analiti nelle urine (11, 20-22).

Ad oggi, sono presenti sul mercato kit marcati CE-IVD per la determinazione del cortisolo e cortisone liberi urinari con metodi in LC-MS/MS, mentre la determinazione dei derivati tetraidrossilati, anch'essa possibile non più solo in GC-MS ma anche in LC-MS/MS, è ancora effettuata con metodi fatti in casa.

La corretta identificazione di deficit dell'enzima 11 $\beta$ HSD2 riveste un ruolo chiave nella diagnosi di pazienti con AME. È dibattuto il ruolo dell'identificazione di deficit enzimatici parziali in pazienti ipertesi essenziali, nei quali è stato documentato (con prevalenza variabile) uno sbilanciamento nel rapporto degli steroidi urinari, in particolare mettendolo in relazione di volta in volta con la sodio-sensibilità, con dei livelli pressori più elevati, con la risposta ai diuretici tiazidici (23-31).

Di particolare interesse dal punto di vista terapeutico in pazienti ipertesi con deficit enzimatico anche parziale, è la potenziale maggior risposta alla terapia diuretica, trattandosi di una forma di ipertensione a volume espanso (27, 31). Purtroppo non ci sono ad oggi studi di intervento con dimostrazione definitiva di diversa risposta alla terapia diuretica.

## CONCLUSIONI

La stima accurata di un deficit dell'enzima 11 $\beta$ HSD2 non presenta oggi un unanime consenso in letteratura su quale sia l'indice più accurato da utilizzare a scopo diagnostico, malgrado l'interesse si stia gradualmente spostando dalla determinazione del rapporto THFs/THE a quella del rapporto UFF/UFE.

Molti studi hanno tuttavia dimostrato la fattibilità di poter misurare entrambi gli indici con metodi in LC-MS/MS accurati e riproducibili.

Saranno necessari ulteriori studi clinici per stabilire in modo definitivo la sensibilità e specificità di questi indici nelle varie condizioni fisiopatologiche associate al deficit di 11 $\beta$ HSD2.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Funder JW. Apparent mineralocorticoid excess. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;165:151-3.
2. Agarwal AK, Rogerson FM, Mune T, et al. Gene structure and chromosomal localization of the human HSD11K gene encoding the kidney (Type 2) isozyme of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Genomics* 1995;29:195-9.
3. Fjeld CC, Birdsong WT, Goodman RH. Differential binding of NAD<sup>+</sup> and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9202-7.
4. Quinkler M, Stewart PM. Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2384-92.
5. Pizzolo F, Friso S, Morandini F, et al. Apparent mineralocorticoid excess by a novel mutation and epigenetic modulation by HSD11B2 promoter methylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1234-E1241.
6. Wang Y, Ma L, Shu X, et al. Apparent mineralocorticoid excess caused by a novel mutation in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. *J Hypertens* 2017;35:647-50.
7. Yau M, Azkawi HSA, Haider S, et al. A novel mutation in HSD11B2 causes apparent mineralocorticoid excess in an Omani kindred: Novel mutation in HSD11B2. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1376:65-71.
8. Agalou S, Butt AN, Chowienczyk P, et al. Hypertension and circulating mRNA for 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:290-5.
9. Friso S, Pizzolo F, Choi S-W, et al. Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis* 2008;199:323-7.
10. Stewart PM, Corrie JE, Shackleton CH, et al. Syndrome of

- apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Invest* 1988;82:340-9.
11. Antonelli G, Artusi C, Marinova M, et al. Cortisol and cortisone ratio in urine: LC-MS/MS method validation and preliminary clinical application. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:213-20.
  12. Palermo M, Shackleton CHL, Mantero F, et al. Urinary free cortisone and the assessment of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;45:605-11.
  13. Best R, Walker BR. Additional value of measurement of urinary cortisone and unconjugated cortisol metabolites in assessing the activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in vivo. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:231-6.
  14. Ferrari P, Sansonnens A, Dick B, et al. In vivo 11 $\beta$ -HSD-2 activity: variability, salt-sensitivity, and effect of licorice. *Hypertension* 2001;38:1330-6.
  15. Gant CM, Minovic I, Binnenmars H, et al. Lower renal function is associated with derangement of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in type 2 diabetes. *J Endocr Soc* 2018;2:609-20.
  16. Mongia A, Vecker R, George M, et al. Role of 11 $\beta$ HSD type 2 enzyme activity in essential hypertension and children with chronic kidney disease (CKD). *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3622-9.
  17. Inada M, Iwasaki K, Imai C, et al. Spironolactone effective hypertension in the elderly due to 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -hsd2) impairment: contributory role of determining serum cortisol/cortisone ratio as a marker of 11 $\beta$ -hsd2 activity. *Intern Med* 2008;47:2157-64.
  18. Campino C, Carvajal CA, Cornejo J, et al. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-2 and type-1 (11 $\beta$ -HSD2 and 11 $\beta$ -HSD1) and 5 $\beta$ -reductase activities in the pathogenesis of essential hypertension. *Endocrine* 2010;37:106-14.
  19. Palermo M, Delitala G, Mantero F, et al. Congenital deficiency of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (apparent mineralocorticoid excess syndrome): Diagnostic value of urinary free cortisol and cortisone. *J Endocrinol Invest* 2001;24:17-23.
  20. Cuzzola A, Mazzini F, Petri A. A comprehensive study for the validation of a LC-MS/MS method for the determination of free and total forms of urinary cortisol and its metabolites. *J Pharm Biomed Anal* 2014;94:203-9.
  21. Taylor RL, Machacek D, Singh RJ. Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. *Clin Chem* 2002;48:1511-9.
  22. Kosicka K, Siemiątkowska A, Pałka D, et al. Detailed analysis of cortisol, cortisone and their tetrahydro- and allo-tetrahydrometabolites in human urine by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2017;140:174-81.
  23. Olivieri O, Pizzolo F, Ravagnani V, et al. Urinary cortisol to cortisone metabolites ratio in prednisone-treated and spontaneously hypertensive patients. *J Hypertens* 2008;26:486-93.
  24. Walker BR, Stewart PM, Shackleton CHL, et al. Deficient inactivation of cortisol by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in essential hypertension. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:221-7.
  25. Agarwal AK, Giacchetti G, Lavery G, et al. CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension* 2000;36:187-94.
  26. Ferrari P, Krozowski Z. Role of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. *Kidney Int* 2000;57:1374-81.
  27. Williams TA, Mulatero P, Filigheddu F, et al. Role of HSD11B2 polymorphisms in essential hypertension and the diuretic response to thiazides. *Kidney Int* 2005;67:631-7.
  28. Mariniello B, Ronconi V, Sardu C, et al. Analysis of the 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 2005;18:1091-8.
  29. Carvajal CA, Romero DG, Mosso LM, et al. Biochemical and genetic characterization of 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in low-renin essential hypertensives. *J Hypertens* 2005;23:71-7.
  30. Melander O. No evidence of a relation between 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenasetype 2 activity and salt sensitivity. *Am J Hypertens* 2003;16:729-33.
  31. Tapia-Castillo A, Baudrand R, Vaidya A, et al. Clinical, biochemical, and genetic characteristics of "nonclassic" apparent mineralocorticoid excess syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:595-603.
  32. Hammer F, Stewart PM. Cortisol metabolism in hypertension. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:337-53.

## URIT 11F dipstick for proteinuria testing: comparison with quantitative protein assay and evaluation of the diagnostic accuracy for proteinuria detection in a outpatient population

Tülay Köken<sup>1</sup>, Nurhan Doğan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Department of Biostatistics, School of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the diagnostic performances of URIT 11F urine dipstick assay for the detection of proteinuria comparing it with a quantitative method. 5743 urine test results [urine dipstick, urine protein and creatinine concentrations and the calculated protein to creatinine ratio (PCR)] were collected from outpatients with various clinical conditions. The agreement between the URIT 11F urine dipstick and quantitative protein assay was examined. To evaluate the accuracy of urine dipstick results for proteinuria detection, we used two different cut-offs: PCR  $\geq 200$  mg/g and  $\geq 150$  mg/g. Dipstick test results (negative, trace, 1+, 2+, 3+) were allocated to five levels of urine protein concentration (<14, 14-30, 30.1-100, 100.1-300, >300 mg/dL) respectively. There was an agreement with a Kappa coefficient of 0.341 and  $p < 0.001$ . When PCR  $\geq 200$  mg/g was used as cut-off and "> negative" was classified as a positive dipstick result, the agreement of the URIT 11F dipsticks improved substantially. The findings of our study show a fair agreement between URIT 11F dipstick results and the quantitative method for urine protein. However, our results show also a high number of false negative results with dipstick testing. While second level laboratory testing can eliminate the false positive results, false negative results could cause a delay in beneficial early treatment of incipient nephropathy. For this reason, more sensitive proteinuria screening test for patients with potential early stage renal diseases should be used.

### INTRODUCTION

Proteinuria is an important marker for the diagnosis and follow-up of renal diseases. There are two known approaches for measuring proteinuria: quantitative and semi-quantitative methods. The quantitative method utilizes either the 24-hour urine collection (considered the gold standard) or the spot urine protein (or albumin) to creatinine ratio. These measurements are usually performed in clinical laboratories on automated analyzers. The semi-quantitative method can be performed by dipstick assessment on a single spot urine sample.

The 24-hour or timed collections are difficult in practice, and several studies (1-3), have shown poor compliance, that can result in inaccurate collections. Therefore, current clinical practice guidelines recommend spot urine total protein or albumin corrected for urine creatinine concentrations as the method of choice for the evaluation of proteinuria (4-5). However,

protein, albumin and creatinine measurements are expensive, the results are not immediately available and require a clinical laboratory to be performed. Urine dipsticks are less expensive, easy to use, widely available, and provide a rapid point of care information to clinicians. For these reasons, despite a well-known lack of sensitivity, urine dipstick testing remains a popular tool in epidemiologic surveys and in clinical practice, especially in resource-poor settings.

Various types of reagent strips (protein dipsticks) have been proposed to detect proteinuria. There are a number of studies evaluating the diagnostic accuracy of these tests to detect proteinuria (6-9); however, URIT 11F has not been evaluated yet. The aim of this study is to assess the agreement of the URIT 11F urine dipstick with quantitative protein assay for the detection of proteinuria in outpatients with various clinical conditions and to evaluate its diagnostic accuracy using quantitative methods for protein to creatinine ratio (PCR) determination as comparison.

Corrispondenza a: Tülay Köken, Afyonkarahisar Health Science University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry Ali Çetinkaya Campuse B Block 03200-Afyon, Turkey; E-mail tkoken1967@yahoo.com

Ricevuto: 05.09.2018

Revisionato: 05.11.2018

Accettato: 27.11.2018

Pubblicato on-line: 04.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2018.003

## MATERIAL AND METHODS

We examined 5743 samples (random or first-morning urine void) from adult patients (2257 men and 3486 women, aged  $54 \pm 13$  and  $52 \pm 14$  years respectively) who visited our hospital between January and December 2017 and collected the results of both the strip test assay and the quantitative measurements. Dipstick urinalysis for proteinuria was performed using an Urit-1600 automated analyzer (URIT Medical Electronic Co., Ltd., China) using the URIT 11F strip test from the same company. Protein detection is based on the tetrabromophenol blue reagent, calibrated to indicate trace at 0-30 mg/dL, 1+ at urine protein concentration 30-100 mg/dL, 2+ at urine protein concentration 100-300 mg/dL, and 3+ at urine protein concentration >300 mg/dL. Both urine protein and creatinine concentrations were measured using Roche Cobas C501 analyzer (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Switzerland) using benzethonium chloride and Jaffé methods respectively. Results were expressed as PCR (mg/g).

To evaluate the accuracy of urine dipstick for proteinuria, two different cut-offs have been used: PCR  $\geq 200$  mg/g or PCR  $\geq 150$  mg/g. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) have been calculated to evaluate the capacity of the strip analysis to classify the patients as negative or positive (trace or more) for proteinuria detection.

The number of true-positive (TP), false-positive (FP), true-negative (TN), and false-negative (FN) test results were calculated for dipstick test when compared to PCR. According to these results, sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy with their confidence intervals (CI 95%) were calculated. Accuracy was calculated as the percentage of true results (both TP and TN) out of the total number of cases examined. Statistical analysis of agreement between urine dipstick and quantitative protein concentration was performed using the Weighted Kappa agreement test. Differences between groups were assessed by chi-square test. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. All statistical inference was performed on MedCalc Statistical Software version 17.9.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2017).

## RESULTS

5743 results have been obtained. A negative dipstick result was obtained in 4216 (73.4%) of tests and trace positive in 448 (7.8%), 1+ in 390 (6.8%), 2+ in 327 (5.7%), and 3+ in 362 (6.3%). The agreement between the URIT 11F urine dipstick and quantitative protein assay is shown in Table 1. Dipstick test results (negative, trace, 1+, 2+, 3+) were allocated to five levels of urine protein concentration (<14, 14-30, 30.1-100, 100.1-300, >300 mg/dL) respectively. The Weighted Kappa coefficient was 0.341,  $p < 0.001$ .

When PCR  $\geq 200$  mg/g was used as cut-off, 2016 patients were positive for proteinuria; when the cut-off was set to 150 mg/g, 2712 patients were positive. The number of samples collected around the cut-off value ( $\pm 25$  %) was 1070 (18.6%) for PCR  $\geq 200$ , 1456 (25.4 %) for PCR  $\geq 150$ .

The diagnostic accuracy of a negative dipstick test result in identifying a PCR value of  $\geq 200$  mg/g is shown in Table 2. The negative predictive value was slightly increased compared with the threshold of  $\geq$  trace for test positivity (80.6% vs 77.0%). Test sensitivity increased (59.8% vs 47.3%), but specificity decreased (91.7% vs 96.9%).

When PCR  $\geq 150$  mg/g was set as cut-off and trace or more was set as a positive dipstick result, the positive predictive value of result for detecting proteinuria was the highest (92.5%).

As shown in Table 2, false-positive rate with trace or more, dipstick results (when PCR  $\geq 150$  mg/g) was lower (2.7 %) in comparison to the all the other dipstick results. We found fewer FN values (40.1%) when PCR  $\geq 200$  mg/g was chosen as cut-off and "negative" was classified as a positive dipstick result.

## DISCUSSION

The detection of low concentrations of proteinuria is important in conditions such as diabetes mellitus (10), pregnancy (11), and hypertension (12). Since strip tests are both rather inexpensive and easy to use, they are often used for screening of proteinuria in these diseases. In agreement with previous studies, our results show that the urine protein test strips are inadequate to evaluate low-grade proteinuria. As in all screening tests, it is

**Table 1**  
Comparison of URIT F11 to quantitative protein assay

Dipstick (mg/dL)	Protein concentration in urine (mg/dL)				
	<14	14-30	30.1-100	100.1-300	>300
Negative	2629	1282	282	16	7
Trace (0-30)	43	177	216	11	0
1+ (30.1-100)	13	65	275	34	2
2+ (100.1- 300)	2	12	102	186	28
3+ (>300)	7	4	98	115	137

**Table 2**  
Diagnostic performance of the urine dipstick test for proteinuria

		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	FP (%)	FN (%)	Accuracy (%)
PCR $\geq$ 200 mg/g (n, 2016)	Dipstick protein >Negative (n, 1527)	59.8 (57.7-62.0)	91.7 (90.7-92.6)	79.8 (77.9-81.6)	80.6 (79.8-81.4)	8.3	40.1	85.8
	Dipstick protein $\geq$ Trace (n, 1080)	47.3 (45.2-49.5)	96.9 (96.2-97.4)	89.2 (87.3-90.9)	77.0 (76.3-77.7)	3.1	52.7	81.3
PCR $\geq$ 150 mg/g (n, 2712)	Dipstick protein > Negative (n, 1527)	48.1 (46.3-50.0)	92.7 (91.7-93.6)	85.5 (83.8-87.1)	66.6 (65.8-67.5)	7.3	51.8	71.7
	Dipstick protein $\geq$ Trace (n, 1080)	36.8 (35.0-38.7)	97.3 (96.7-97.9)	92.5 (90.8-93.9)	63.3 (62.6-63.9)	2.7	63.2	68.7

PCR, protein to creatinine ratio; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; FP, false-positive; FN, false-negative. The values in brackets are 95% Confidence Intervals.

important that all patients with proteinuria have a positive strip test result (high sensitivity), whereas the number of patients with FP results (low specificity) is considered somewhat less important, as these patients would be identified using a second level confirmatory test. In this study we found significant evidence of a high FN rate and a poor NPV of the strip test when compared with the quantitative method. This suggests that a negative dipstick result is insufficient to exclude a low-grade proteinuria. If we use the routine dipstick urine tests to identify patients with potential early stage renal diseases, chances of beneficial treatment could be delayed or lost.

In this study, the URIT 11F dipstick results have been compared with urine PCR. PCR was suggested in the 2012 Kidney Disease Outcomes Quality Initiative guideline as an alternative method to detect proteinuria, and PCR <150 mg/g was approved as the cut-off for proteinuria (5). Although albumin to creatinine ratio is the preferred test, PCR is more widely used in developing countries because of the cost. We used two different cut-offs for PCR:  $\geq$ 200 mg/g or  $\geq$ 150 mg/g. When PCR  $\geq$ 200 mg/g was used and "> negative" was set as a positive dipstick result, the agreement between the two methods improved substantially. These results show that the used cut-off has a major impact on the accuracy of the dipsticks or on the comparability to quantitative methods.

Several screening studies in outpatient populations have been conducted to evaluate the diagnostic accuracy of various commercial brand of reagent strips for proteinuria. From their analysis of 6,801 adults older than 60 years from an outpatient department, Lim et al (13) reported sensitivity, specificity, PPV, and NPV for the detection of PCR  $\geq$ 200 mg/g of 90.9%, 87.2%, 81.5%, and 94%, respectively based on a dipstick result of trace or higher by using Clinitek Atlas 10 dipstick. Differences in participant characteristics between our cohort and this cohort, in particular the older age distribution, and notably a high prevalence of albuminuria (43%), may explain the observed differences in the dipstick test performance. Disease

prevalence is a significant determinant of test performance. Sensitivity may be increased when disease prevalence is high because a greater number of individuals may have severe disease, resulting in more extreme values (14). In another study, that included 800 adults from inpatient and outpatient departments, PPV and NPV for the detection of quantitative urine protein  $\geq$ 300 mg/L (30 mg/dL) were 83%, and 98% respectively, based on a dipstick result of trace or higher by using Multistix 10SG (15). Since the Authors used a higher cut-off than the one used in our study, they obtained a higher NPV. Chang et al (16) obtained 45% sensitivity, 98.3% specificity, 83% PPV, 91% NPV when PCR  $\geq$ 150 mg/g was chosen as cut-off and "1+ or more" was set as a positive dipstick result (Clinitek Atlas® PRO™ 12 Reagent Pak). In this study, a random midstream urine samples from 2932 subjects participating in regular clinical examinations was used. Except NPV, the results of these studies are similar to ours. The difference in NPV is probably due to the different analytical properties of the dipsticks. Actually, they used an automated urine testing system including a traditional dipstick protein testing pad and a relatively new low-protein pad together with a semi-quantitative creatinine pad to correct for the possible effect of urine dilution in the protein detection.

To date, many urine strip tests from different manufacturers have been compared with quantitative urine protein test (17, 18). In this study we wanted to assess the agreement of the URIT 11F dipstick with quantitative method for urine protein. The findings of our study showed a fair agreement between URIT 11F dipstick and a quantitative method. In addition, a high number of FN values were found. Studies have shown that the causes of negative results could be attributed to acidic and/or dilute urine (15). Urine specific gravity and pH were not recorded in our study; therefore, the effect of urine concentration and pH on test performance was not assessed.

In conclusion, the findings of our study show that a fair agreement between URIT 11F dipstick and quantitative method. Also, our results show a high FN

number with the dipstick testing. While subsequent laboratory testing can eliminate false positive, FN results could cause a delay in beneficial early treatment of nephropathy. For this reason, more sensitive proteinuria screening test for patients with potential early stage renal diseases should be developed and marketed.

### CONFLICT OF INTEREST

None.

### REFERANCES

1. Morales JV, Weber R, Wagner MB, et al. Is morning urinary protein/creatinine ratio a reliable estimator of 24-hour proteinuria in patients with glomerulonephritis and different levels of renal function? *J Nephrol* 2004;17:666-72.
2. Gaspari F, Perico N, Remuzzi G. Timed urine collections are not needed to measure urine protein excretion in clinical practice. *Am J Kidney Dis* 2006;47:1-7.
3. Shaw AB, Risdon P, Lewis-Jackson JD. Protein creatinine index and Albustix in assessment of proteinuria. *Br Med J* 1983;287:929-32.
4. National Institute for Health and Care Excellence. Clinical guideline of Chronic kidney disease in adults: assessment and management. Published: 23 July 2014 [www.nice.org.uk/guidance/cg182](http://www.nice.org.uk/guidance/cg182). (last visited: October 2018).
5. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International* 2013;3(suppl1 1):1-163.
6. Ko K, Kwon MJ, Ryu S et al. Performance evaluation of three URiSCAN devices for routine urinalysis. *J Clin Lab Anal* 2016;30:424-30.
7. Gyure WL. Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin Chem* 1977;23:876-9.
8. Chang CC, Su MJ, Ho JL et al. The efficacy of semi-quantitative urine protein-to-creatinine (P/C) ratio for the detection of significant proteinuria in urine specimens in health screening settings. *Springerplus*. 2016;5:1791.
9. Wallace JF, Pigua MJ, Lott JA et al. Multisite evaluation of a new dipstick for albumin, protein, and creatinine. *J Clin Lab Anal* 2001;15:231-5.
10. Liang H, Kennedy C, Manne S, et al. Monitoring for proteinuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diabetes Research and Care* 2015;3:e000071.
11. Airoidi J, Wenstein L. Clinical significance of proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:117-24.
12. Maione A, Annemans L, Sreippoli G. Proteinuria and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hyperten* 2009;22:1137-47.
13. Lim D, Lee DY, Cho SH et al. Diagnostic accuracy of urine dipstick for proteinuria in older outpatients. *Kidney Res Clin Pract* 2014;33:199-203.
14. Leeflang MM, Bossuyt PM, Irwig L. Diagnostic test accuracy may vary with prevalence: implications for evidence-based diagnosis. *J Clin Epidemiol* 2009;62:5-12.
15. Wallace JF, Pugia MJ, Lott JA, et al. Multisite evaluation of a new dipstick for albumin, protein, and creatinine. *J Clin Lab Anal* 2001;15:231-5.
16. Chang CC, Su Ming MJ, Ho JL et al. The efficacy of semiquantitative urine protein-to creatinine (P/C) ratio for the detection of significant proteinuria in urine specimens in health screening settings. *Springerplus* 2016;5:1791.
17. De Silva DA, Halstead AC, Cote AM et al. Urinary dipstick proteinuria testing: does automated strip analysis offer an advantage over visual testing? *J Obstet Gynaecol Can* 2014;36:605-12.
18. Davidson MB, Smiley JF. Relationship between dipstick positive proteinuria and albumin: creatinine ratios. *J Diab Comp* 1999;13:52-5.

## L'interferenza dell'emolisi sulla misura dell'insulina

Federica de Liso<sup>1</sup>, Loredana Maldari<sup>1</sup>, Paola De Corato<sup>1</sup>, Mattia Speroni<sup>1</sup>, Rita Maiavacca<sup>1</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

### ABSTRACT

**Analytical interference of hemolysis on serum insulin measurement.** Insulin is a polypeptide hormone, secreted from pancreatic  $\beta$ -cell, involved in the regulation of glucose and lipid metabolism. Insulin measurement is a useful tool to identify some clinical conditions, such as fasting hypoglycemia, some types of diabetes, the presence of insulin resistance. An important pre-analytical aspect that influences the determination of insulin serum concentration is the presence of hemolysis. In fact, it is well known that insulin is degraded by a protease released by red blood cells after hemolysis. The aim of this study is to evaluate the interference of hemolysis on insulin measurements performed by a chemiluminescence method. To study the effect of hemolysis on insulin degradation, we added increasing concentrations of red blood cell hemolysate to a serum pool with known insulin concentration. The reduction of insulin levels was affected by the degree of hemolysis, by the time elapsed before the assay and by the temperature of samples storage. Our results show that insulin values do not decrease significantly (<10%) when hemolysis is <2.0 g/L of free hemoglobin (corresponding to H-index=200) if samples are maintained at low temperatures (i.e. in an ice-water slurry) until the assay is performed.

### INTRODUZIONE

L'insulina è un ormone peptidico prodotto dalle cellule beta delle isole di Langerhans del pancreas ed è coinvolto nel metabolismo del glucosio e dei lipidi. La secrezione di insulina promuove la captazione del glucosio principalmente da parte del tessuto adiposo, epatico e muscolare. La valutazione della concentrazione ematica di insulina è parte del percorso diagnostico di condizioni cliniche quali l'ipoglicemia a digiuno, alcune forme di diabete mellito e nelle indagini su pazienti in cui è importante confermare il sospetto di un'insulino-resistenza. In quest'ultimo caso, il valore di insulina può essere utilizzato come parametro per il calcolo degli indici di insulino-sensibilità, quali per esempio l'*Homeostasis Model Assessment Estimated Insulin Resistance Index* (HOMA-IR) (1) in cui piccole variazioni nella misurazione dell'insulina possono determinare una misclassificazione del paziente. È noto che l'emolisi può interferire con la misura dell'insulina a causa di un enzima (insulinasi) contenuto negli eritrociti, in grado di degradare l'ormone, determinando una sottostima nella sua misurazione (2-3). La determinazione dell'insulina si esegue con dosaggi immunometrici e

nelle istruzioni d'uso di molti kit commerciali è indicato di non eseguire la misura dell'insulina se il campione è emolizzato, senza però che venga segnalato quale sia l'indice di emolisi oltre il quale è necessario invalidare il risultato. Questa indicazione porterebbe a non eseguire un elevato numero di campioni, specialmente per i pazienti pediatrici e adulti che si sottopongono ad esami come il test orale di tolleranza al glucosio (OGTT) o la curva insulinemica, per i quali sono previsti più prelievi seriali e in cui, non di rado, si utilizza un catetere venoso periferico come l'agocannula che più facilmente può causare l'emolisi del campione (4-5).

In letteratura (2, 3, 6) è riferito che il mantenimento a basse temperature dei campioni emolizzati può inibire l'effetto dell'enzima limitando la degradazione dell'insulina.

Scopo di questo studio è valutare l'interferenza da emolisi sulla misurazione dell'insulina, determinata con metodo in chemiluminescenza, stabilire quale concentrazione di emoglobina (Hb) libera, misurata come indice di emolisi (H-Index), può essere tollerata e quali possibili soluzioni adottare per limitare il numero di campioni non processabili a causa dell'emolisi.

Corrispondenza a: Federica de Liso, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via San Barnaba 8, 20122 Milano, Tel 02 55032582, E-mail federica.deliso@policlinico.mi.it

Ricevuto: 05.12.2018

Revisionato: 16.01.2019

Accettato: 23.01.2019

Pubblicato on-line: 12.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.014

## METODI

La concentrazione sierica di insulina è stata misurata con metodo immunometrico non competitivo in elettrochemiluminescenza su piattaforma automatizzata Cobas® e602 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), metodo standardizzato contro il 1° Standard di Riferimento IRP 66/304 (NIBSC) dell'Organizzazione mondiale della sanità. L'intervallo di misurazione è di 0,2-1000 mIU/L e il coefficiente di variazione analitico è < 5%.

La determinazione è stata eseguita su campioni di siero ottenuto da provette con o senza gel separatore e su campioni di plasma ottenuto da provette contenenti litio-eparina.

### Pool di sieri

Sono stati preparati unendo campioni residui della medesima giornata scelti in modo da avere una concentrazione di insulina superiore al limite inferiore dell'intervallo di riferimento per questo analita (2,6 mIU/L) e con indice di emolisi molto basso (H-Index <10). Tali pool di sieri sono stati congelati a -20 °C fino al giorno in cui sono state eseguite le prove.

### Emolisato

È stato preparato da campioni di sangue raccolti in provette con litio-eparina (7). Dopo centrifugazione (3500 g per 8 minuti), il plasma veniva eliminato e sostituito con una eguale quantità di soluzione fisiologica in cui le cellule venivano risospese. Tale procedura di lavaggio delle emazie è stata ripetuta per 5 volte, l'aggiunta finale è stata di acqua distillata. Il campione così preparato è stato posto in congelatore a -20 °C. Il giorno dell'esperimento, dopo scongelamento, l'emolisato è stato centrifugato in modo da eliminare i residui degli eritrociti lisati e la concentrazione di emoglobina, è stata misurata con l'analizzatore XN1000 (Sysmex, Kobe, Japan).

L'emolisato (Hb 108 g/L) è stato diluito 1:10 con soluzione fisiologica e misurato con Cobas® c702 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ottenendo un valore di H-Index pari a 1100 (1 punto di H-Index è pari a circa 1 mg/dL di Hb libera). Quantità opportune di emolisato diluito sono state poi aggiunte ai pool di sieri in modo da ottenere le concentrazioni desiderate di Hb libera.

### Analisi statistica

La variazione percentuale dell'insulina è stata misurata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ cambiamento} = \left[ \frac{\text{concentrazione di insulina basale} - \text{concentrazione di insulina corretta per il fattore di diluizione dovuto all'aggiunta dell'emolisato}}{\text{concentrazione di insulina basale}} \right] \times 100$$

in cui per livelli di insulina basali ci si riferisce alla concentrazione di insulina misurata in assenza di emolisi. Una variazione superiore al 10% è stata considerata come interferenza clinicamente significativa.

Tutte le analisi sono state effettuate su campioni residui trattati in modo anonimo.

## RISULTATI

### Effetto del grado di emolisi sulla concentrazione di insulina sierica

Un pool di sieri con concentrazione di insulina di 18,01 mIU/L è stato suddiviso in 10 aliquote a ciascuna delle quali è stata aggiunta una quantità crescente di emolisato. I campioni sono stati misurati immediatamente dopo tale aggiunta.

I risultati sono riportati nella Tabella 1.

### Effetto del tempo sulla concentrazione di insulina in campioni con vari gradi di emolisi

Una seconda valutazione è stata effettuata sui medesimi campioni mantenuti a temperatura ambiente circa 180 minuti.

In questo caso, la variazione nella concentrazione di insulina è apprezzabile, come è possibile osservare nella Figura 1. Già con un H-index di 65 si ottiene una riduzione della concentrazione di insulina >10% (16,15 mIU/L).

### Influenza combinata di tempo e temperatura di conservazione sui valori di insulina in campioni con vari gradi di emolisi

Un pool di sieri con concentrazione di insulina di 33,31 mIU/L è stato suddiviso in 3 aliquote a cui sono state aggiunte quantità scalari di emolisato diluito. Ciascuna aliquota è poi stata suddivisa in due: una conservata a temperatura ambiente, la seconda posta in una miscela di acqua e ghiaccio.

Nella Tabella 2 sono riportati i valori dell'H-Index e i corrispondenti valori di insulina al tempo 0 e dopo 90 e 180 minuti in presenza di tre gradi di emolisi crescente, mantenendo i campioni a temperatura ambiente.

Anche in questo caso è stato confermato come valore massimo di emolisi accettabile per campioni conservati 3 ore a temperatura ambiente un H-Index di circa 50, valore oltre il quale la riduzione della concentrazione di insulina è risultata essere significativa.

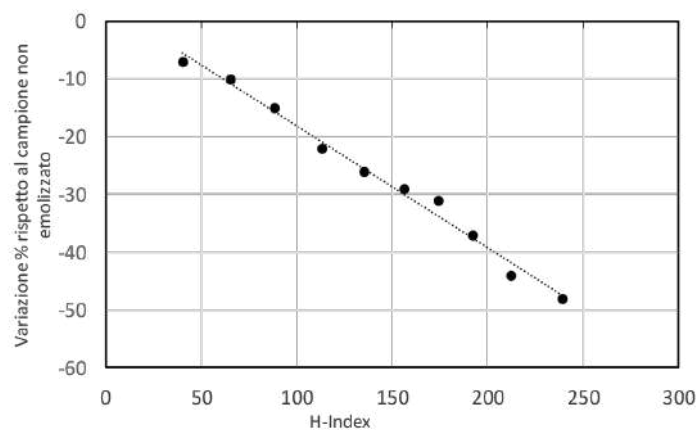
Nella Tabella 3 sono riportati i valori dell'H-Index e i corrispondenti valori di insulina al tempo 0 e dopo 90 e 180 minuti in presenza di tre gradi di emolisi crescente, mantenendo i campioni in una miscela di acqua e ghiaccio.

Come è possibile osservare nella Figura 2, la concentrazione misurata dell'insulina nei campioni tenuti in una miscela di acqua e ghiaccio sembra essere minimamente influenzato dal tempo e dal grado di

**Tabella 1**

Effetto sulla misura dell'insulina dell'aggiunta dell'emolisato ad un pool di sieri, analisi immediata.

	H-Index (mg/dL di Hb)	Insulina (mIU/L)	Variazione %
1	40	18,01	-
2	65	18,05	0,22
3	88	18,21	1,11
4	113	18,04	0,17
5	135	18,34	1,82
6	156	17,85	-0,90
7	174	18,11	0,54
8	192	18,12	0,61
9	212	17,73	-1,58
10	239	17,55	-2,55

*H-index, indice di emolisi***Figura 1**

Effetto dell'emolisi sulla concentrazione di insulina misurata in campioni conservati per 180 minuti a temperatura ambiente. H-index, indice di emolisi

**Tabella 2**

Variazione delle concentrazioni di insulina in funzione del grado di emolisi e del tempo di conservazione mantenendo i campioni a temperatura ambiente.

H-Index misurato (mg/dL Hb)	[insulina] <sub>t0</sub> (mIU/L)	delta % t0	[insulina] <sub>t90</sub> (mIU/L)	delta % t90	[insulina] <sub>t180</sub> (mIU/L)	delta % t180
4	33,31	-	32,22	-3,3	32,79	-1,6
56	33,62	0,9	29,17	-12,4	29,8	-10,4
109	33,67	1,1	27,14	-18,5	26,2	-21,2
187	33,94	1,9	22,85	-31,4	19,38	-41,8

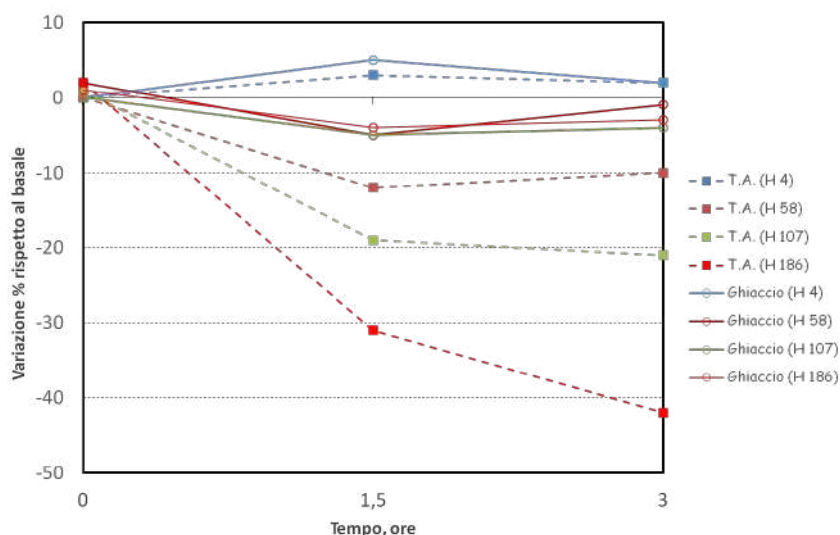
*H-index, indice di emolisi; Insulina t0, t90, t180, concentrazione plasmatica dell'insulina dopo 0, 90 e 180 minuti dall'aggiunta dell'emolisato; delta % t0, t90 e t180, variazione percentuale della concentrazione plasmatica dell'insulina rispetto al valore del campione in assenza di emolisi dopo 0, 90 e 180 minuti dall'aggiunta dell'emolisato.*

**Tabella 3**

Variatione delle concentrazioni di insulina in funzione del grado di emolisi e del tempo di conservazione mantenendo i campioni in una miscela di acqua e ghiaccio.

H-Index misurato (mg/dL Hb)	[insulina] <sub>t0</sub> (mIU/L)	delta % t0	[insulina] <sub>t90</sub> (mIU/L)	delta % t90	[insulina] <sub>t180</sub> (mIU/L)	delta % t180
4	33,48	-	31,69	-5,3	32,97	-1,5
58	33,23	2,2	31,77	-5,1	33,80	1,2
107	33,44	-0,1	31,79	-5,0	32,20	-3,5
186	33,97	1,5	31,99	-4,4	32,40	-3,1

H-index, indice di emolisi; t0, t90, t180, concentrazione plasmatica dell'insulina dopo 0, 90 e 180 minuti dall'aggiunta dell'emolisato; delta % t0, t90 e t180, variazione percentuale della concentrazione plasmatica dell'insulina rispetto al valore del campione in assenza di emolisi dopo 0, 90 e 180 minuti dall'aggiunta dell'emolisato.

**Figura 2**

Variatione delle concentrazioni misurate di insulina in funzione del grado di emolisi [indice di emolisi (H) da 4 a 186 corrispondente ad un valore di Hb libera da circa 4 a circa 186 mg/dL], del tempo e della temperatura di conservazione. TA, temperatura ambiente; Ghiaccio, campioni conservati in una miscela di acqua e ghiaccio

emolisi rispetto ai campioni con egual emolisi ma tenuti a temperatura ambiente. Inoltre è apprezzabile come la concentrazione di insulina nel siero senza emolisato aggiunto (H-Index=4) sia pressoché costante indipendentemente dalla temperatura di conservazione fino al tempo di 180 minuti.

L'influenza dell'emolisi sulla concentrazione di insulina è dipendente dal grado dell'emolisi stessa e aumenta se il campione viene conservato a temperatura ambiente.

L'attività enzimatica viene bloccata o rallentata se il campione viene tenuto in una miscela di acqua e ghiaccio; in questo caso, l'H-index tollerabile è >180 (>180 mg/dL di Hb libera).

## DISCUSSIONE

La determinazione delle concentrazioni di insulina gioca un ruolo chiave nella valutazione dell'ipoglicemia e dell'insulino-resistenza, della presenza di insulinoma e della funzionalità delle cellule beta pancreatiche nella produzione dell'ormone.

Il fenomeno dell'emolisi, non così infrequente soprattutto nei pazienti pediatrici, il più delle volte accade in vitro ed è spesso riconducibile al momento del prelievo (8).

In questo studio abbiamo verificato l'interferenza negativa dell'emolisi nella determinazione dei livelli di insulina, in accordo con gli altri studi della letteratura (2-5).

Prima di questo studio, il laboratorio adottava un H-

index di 50 come limite di accettabilità al di sopra del quale il risultato dell'insulina non veniva refertato e questa impostazione, visti i risultati ottenuti, si è confermata essere corretta.

Questo approccio portava però ad avere spesso dati mancanti soprattutto nell'ambito delle curve insulinemiche, rendendo l'interpretazione delle stesse non utile per l'inquadramento dei pazienti.

La prima parte di questo studio evidenzia che, anche in presenza di un'emolisi moderata/elevata (H-index di 200, circa 200 mg/dL di Hb libera), la misurazione immediata del campione permette di ottenere valori di insulina attendibili, che poco si discostano dal valore di insulina misurato sul campione in assenza di emolisi.

Purtroppo questa prima evenienza è del tutto teorica perché non prevede il tempo di trasporto e di centrifugazione della provetta.

L'influenza dell'emolisi diventa significativamente apprezzabile quando la misurazione viene eseguita dopo 180 minuti dall'aggiunta dell'emolisato ai campioni, periodo di tempo che può verosimilmente intercorrere tra il prelievo e l'esecuzione dell'analisi. In questo caso la riduzione delle concentrazioni sieriche di insulina è apprezzabile (scostamento >10%) già per valori di emolisi lievi.

Pertanto la misurazione della concentrazione di insulina è influenzata negativamente dal grado di emolisi e in presenza di questa, anche dal tempo che intercorre tra il prelievo e la misura.

La temperatura di conservazione del campione può limitare il processo di degradazione ad opera dell'enzima rilasciato dagli eritrociti in seguito all'emolisi del campione (2, 9).

L'esperimento da noi effettuato conservando campioni in una miscela di acqua e ghiaccio immediatamente dopo l'aggiunta dell'emolisato ha confermato la quasi totale assenza di interferenza anche dopo una conservazione di 180 minuti. L'apparente incremento della concentrazione di insulina dopo 180 minuti rispetto a 90 minuti (Tabella 3) rientra nella variabilità attesa in base alle prestazioni del metodo analitico (CV circa 5%).

Il controllo della fase pre-analitica risulta pertanto di fondamentale importanza al fine di eseguire una misurazione accurata delle concentrazioni ematiche di insulina.

Dato che la conservazione a basse temperature rallenta la formazione del coagulo è opportuno l'utilizzo di plasma litio eparina.

## CONCLUSIONI

La presenza di Hb libera non interferisce con la misura dell'insulina misurata con Roche Cobas e602, ma la liberazione di un enzima intra-eritrocitario che degrada l'insulina, ne provoca una importante riduzione. La diminuzione della concentrazione misurata di insulina è proporzionale sia all'entità dell'emolisi (espressa in termini di Hb libera nel siero) sia al tempo di contatto. La conservazione del prelievo in una miscela di acqua e ghiaccio, bloccando l'attività enzimatica, limita

significativamente questo fenomeno, consentendo misure accurate anche in presenza di elevati livelli di emolisi (H-index pari a circa 200, corrispondente ad un valore di Hb libera pari a circa 200 mg/dL).

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
2. Cook P, Glenn C, Armstn A. Effect of hemolysis on insulin determination by the Beckmann Coulter Unicell DXI 800 immunoassay analyser. *Clin Biochem* 2010; 43:621-2.
3. Garinet S, Fellahi S, Marlin G, et al. Differential interferences of hemoglobin and hemolysis on insulin assay with the Abbott Architect-Ci8200 immunoassay. *Clin Biochem* 2014;47:445-7.
4. Wu ZQ, Lu J, Chen H, et al. Individualized correction of insulin measurement in hemolyzed serum samples. *Immunol Res* 2017;65:605-8.
5. Bellomo G, Sulas MG, Mairate E, et al. Hemolysis is a major cause of variability in insulin measurement during oral glucose tolerance test in children. *Clin Lab* 2012;58:67-74.
6. Zornitzki T, Blaychfeld-Magnazi M, Knobler H, et al. The effect of phlebotomy-induced hemolysis on insulin level determination. *Endocr Pract* 2015;21:1093-7.
7. Sonntag O, Römer M, Haeckel R. Interferences. In : Haeckel R. ed. *Evaluation methods in laboratory medicine*. Weinheim: VCH 1993.
8. Lippi G, Plebani M, Di Somma S, et al. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:143-53.
9. Chevenne D, Letailleur A, Trivin F, et al. Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. *Clin Chem* 1998;44:354-6.

## Telomere shortening and *PCDH10* promoter methylation in colorectal cancer mucosae

Marco Benati<sup>1</sup>, Elisa Danese<sup>1</sup>, Martina Montagnana<sup>1</sup>, Elisa Paviati<sup>1</sup>, Anna Maria Minicozzi<sup>2</sup>, Milena Gusella<sup>3</sup>, Felice Pasini<sup>4</sup>, Giuseppe Lippi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Clinical Biochemistry Section, Department Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, University of Verona

<sup>2</sup>Colorectal & Peritoneal Oncology Centre, The Christie NHS Foundation Trust, Manchester, Manchester, M20 4BX, United Kingdom

<sup>3</sup>Laboratory of Pharmacology and Molecular Biology, Oncology Department, Rovigo General Hospital, Trecenta, Italy

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Rovigo Hospital, Italy

### ABSTRACT

**Background:** telomerase activity and telomere length (TL) have important implications in several human diseases. Telomere shortening is associated with colorectal carcinogenesis. Recent studies also showed that protocadherin 10 (*PCDH10*) plays a critical role in cancer cell growth, by negatively regulating telomerase activity. *PCDH10* is frequently downregulated by promoter DNA methylation. The aim of this study was to investigate whether *PCDH10* promoter methylation was associated with TL in colorectal cancer (CRC).

**Methods:** DNA was extracted from 35 CRC and 35 adjacent normal tissues with Gentra Purgene Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A quantitative methylation-specific PCR (MSP) based method was used to analyze a selected CpG site in *PCDH10* promoter. TL was evaluated with qPCR and expressed as telomere to single copy gene (T/S) ratio. Differences were assessed with Mann-Whitney test or Wilcoxon signed-ranks test when appropriate, whilst correlation analyses were performed with Spearman's test. Diagnostic performance was calculated with receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

**Results:** we found that TL was significantly lower in CRC than in adjacent non-cancerous tissues ( $p=0.0005$ ). The area under the ROC curve (AUC) for TL was 0.759 (95% Confidence Interval: 0.643-0.875,  $p=0.0002$ ). Aberrant *PCDH10* promoter methylation was detected in 100% of CRC tissues but in none of paired non-cancerous tissues. The median methylation rate in CRC tissues was 55.7% (range: 6.1-97.8%). TL was negatively correlated with *PCDH10* promoter methylation ( $r=-0.42$ ,  $p=0.0002$ ).

**Conclusions:** these results suggest a pivotal role of telomere shortening and *PCDH10* methylation in CRC tissues. TL may be seen as a potential biomarker in CRC diagnostics.

### INTRODUZIONE

Telomeres are non-coding hexameric nucleotide repeats (TTAGGG)<sub>n</sub> at the ends of all linear eukaryotic chromosomes (1). Along with protein complex shelterin, they contribute to form protective and highly conserved nucleoprotein structures, which ultimately facilitate genomic stability and integrity (2).

With continuous shortening, telomeres eventually reach a critical length that triggers replicative

senescence and apoptosis (3-4). Notably, this is thought to represent an essential tumour suppressor mechanism, that limits the cell proliferative capacity (5). Telomerase activity and telomere length (TL) have important implications in human disease and aging (6), and multiple studies have provided substantial evidence supporting their role in colorectal cancer (CRC) development and progression (7-8). Both short and long telomeres have been implicated in carcinogenesis. Many early studies indicated that

Corrispondenza a: Marco Benati, Clinical Biochemistry Section, Department of Neurological, Biomedical and Movement Sciences, University of Verona, Hospital "Policlinico G.B. Rossi", P.le LA Scuro 10, 37134 Verona, Italy, Tel +39 045 8126698, E-mail marco.benati@univr.it

Ricevuto: 28.11.2018

Revisionato: 21.01.2019

Accettato: 05.02.2019

Pubblicato on-line: 16.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.019

shorter telomeres were associated with an increased risk of developing bladder, oesophageal, gastric, head and neck cancers (9). Conversely, other studies showed that longer telomeres were associated with increased risk of lung and bladder cancer, lymphoma and sarcoma (10-13). Interestingly, TL has also been found shorter in CRC tissues than in adjacent normal tissue (14).

Telomerase is a complex ribonucleic reverse transcriptase responsible for synthesizing telomeric DNA repeats at the ends of linear chromosomes. It comprises the catalytic protein subunit telomerase reverse transcriptase (*hTERT*), encoded by the *TERT* gene (located at 5p15.33), an essential RNA component (TERC) that functions as the RNA template for the addition of telomeric repeats (15-16). Elevated telomerase activity represents a hallmark of human cancer (17-18). It has been reliably demonstrated that the limiting factor for telomerase activity is *hTERT* expression, which is tightly regulated at a transcriptional level (19), through epigenetic modifications in the promoter region (20). In a recent study, Zhou et al. demonstrated that protocadherin 10 (*PCDH10*) negatively regulates telomerase activity and inhibits cancer cell proliferation, migration and invasion (21). Accordingly, our research group along with others, showed that *PCDH10* is frequently down-regulated by promoter DNA methylation, and functions as a tumour-suppressor gene in gastric, colorectal and lung cancer, as well as in many other carcinomas (22-24).

The aim of our study was to investigate whether *PCDH10* promoter methylation was associated with TL in colorectal cancer.

## METHODS

### Patients and samples

The study population consisted of 35 CRC patients (mean age 67.7 years, SD 13.8) admitted at the University Hospital of Verona (Italy) between January 2010 and December 2010 for routine colon-rectum biopsy for medical treatment and/or diagnosis. Paired tumour and adjacent normal tissue were obtained during biopsy, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Histological diagnosis and tumour stage were defined as for the 2000 World Health Organization (WHO) classification system for tumours of digestive system (25) and according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system (26), respectively. Detailed demographic and clinical characteristics of CRC patients, including age, gender and Tumor, Metastasis, Lymph nodes (TMN) stage, are shown in Table 1. The study was carried out in accordance with the ethical standards of the revised Declaration of Helsinki and was cleared by the local Review Board.

**Table 1**

*Demographics and clinical features of colorectal cancer patients.*

Variables	CRC patients (n=35)
Mean age, years (SD)	67.7 (13.8)
male n (%)	25 (71.4)
female n (%)	10 (28.6)
AJCC stage, n (%)	
I	2 (5.7)
II	2 (5.7)
III	27 (77.1)
IV	4 (11.5)
AJCC grade, n (%)	
1	1 (2.9)
2	22 (62.8)
3	12 (34.3)

*CRC, colorectal cancer; AJCC, American Joint Committee on Cancer Deviation.*

### Laboratory methods

For *PCDH10* methylation analysis, purified genomic DNA extracted from tissues with Gentra Purgene Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was subjected to bisulphite treatment and purification using the Epitect Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Treated DNA was then subjected to methylation-specific (MSP) polymerase chain reaction (PCR) to analyze methylation status, where two specific sets of primers were used, one designed for methylated (M) and the other for un-methylated (U) *PCDH10* promoter. The following primers sequences were used, methylated primers (forward 5'-AGTTATAGGAGTTTTTACGTAGCGT-3' and reverse 5'-ATATTCCTACTCCTCCTATACCGTA-3') and unmethylated primers (5'-GAAAGTTATAGGAGTTTTTATGTAGTGT-3' and reverse 5'-ATATTCCTACTCCTCCTATACCATA-3').

Parallel with each set of MSP reactions, CpGenome Universal Methylated DNA (Chemicon, Millipore Billerica, MA, USA) was used as 100% methylated control DNA. The MSP products were checked on 2% agarose gel. Measurement of TL was conducted using q-PCR SYBR Green-based assay on 35 available CRC tissues and their matched normal tissue. The primers for telomeres and single copy gene 36B4 (which encodes acidic ribosomal phosphoprotein PO) were added to final concentrations of 0.9  $\mu$ M and 0.3  $\mu$ M, respectively. The following two sets of primers were used as previously reported by Cawthon (27):



## DISCUSSION

Recent studies revealed that cancer stem cells biology is regulated by genetic (e.g., oncogene activation and oncosuppressor gene inactivation) and epigenetic changes (e.g. miRNA targeting and promoter DNA hypo/hypermethylation), which reflect mutations in tumour microenvironment (29-30). These changes are needed for oncogenic transformation and cellular reprogramming, thus resulting in inactivation of a certain number of oncosuppressor proteins (31), differential expression of several miRNAs (32), aberrant methylation of promoters genes (33) and upregulation/reactivation of telomerase (34).

The primary hypotheses linking telomeres and cancer are based on the fact that telomeres progressively shorten after each cell division (1). Telomerase activity is strongly associated with tumour development and may hence play a critical role as a biomarker for early detection of cancer (35).

High telomerase activity or *hTERT* expression has originally been revealed in colorectal tissue (36-37). *hTERT* was then also found to be expressed in non-tumour colorectal tissues by immunohistochemistry (38).

Cancer cells have gained the ability to overcome their route toward senescence via TL maintenance mechanisms, mainly mediated by telomerase activation, but also by alternative mechanisms (alternative lengthening of telomeres – ALT) (17, 39-40). TL is also regulated by genetic and epigenetic marking, thus including *hTERT* alternative splicing (41), *hTERT* promoter mutations (42), *hTERT* promoter methylation (43) and *PCDH10* protein interaction (21). In particular, *PCDH10* is one of the non-clustered protocadherins encoding calcium-dependent adhesion protein, which participates in multiple molecular functions, such as cell adhesion, colony formation and signalling regulation (44,45). This gene was earlier identified as a tumour suppressor gene in many tumours, including nasopharyngeal carcinoma, gastric carcinoma (46) and multiple myeloma (47). In our previous study (48) we found that methylation of *PCDH10* promoter region is a common epigenetic event in colorectal tumours, and that this cancer-specific aberration can be frequently found into the circulation.

To the best of our knowledge, our study has been the very first to analyze TL and *PCDH10* promoter methylation in patients with CRC. A negative correlation was observed between TL and *PCDH10* promoter methylation, which hence support previous findings that *PCDH10* may play a critical role in cancer cell growth, by negative regulation of telomerase activity (21). In agreement with previous studies (49-52), our results also showed that the TL was significantly shorter in CRC tissue than in the adjacent normal counterpart, albeit we failed to demonstrate a correlation between shortened TL and higher histological grading. This apparent discrepancy with data published in other studies (53-54) can be attributed to the different study population, wherein 89% of our patients were diagnosed as having more advanced stages.

The ROC curve analysis on normal and CRC tissue

seemingly reveals that TL has a good diagnostic performance. However, due to limited sample size, we could not draw definitive conclusions about its putative relationship with different tumour stages and grades, thus leading the way to performing more powered studies to assess this issue. Further studies are also needed to elucidate the diagnostic performance of TL into the circulation, as possible CRC biomarker.

TL in plasma samples was previously assessed in two studies. Wu et al. (55) found significantly shortened TL in cell-free DNA (cfDNA) in the plasma of breast cancer patients with no prior treatment. Idei et al. (56) reported similar results in patients with ovarian cancer.

In conclusion, our data suggest that abnormalities in cell-cycle regulator pathways may trigger continuous cell division and critical telomere shortening. Shortened TL may be seen as an active player in colorectal carcinogenesis, thus emerging as a potentially useful early biomarker of CRC along with *PCDH10* hypermethylation.

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## REFERENCES

1. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-60.
2. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008;42:301-34.
3. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2014;15:482-96.
4. Danese E, Lippi G. Telomere length: is the future in our "ends"? *Ann Transl Med* 2018;6:280
5. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: Tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:175-86.
6. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6:611-22.
7. Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, et al. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20:1940-50.
8. Piñol-Felis C, Fernández-Marcelo T, Viñas-Salas J, et al. Telomeres and telomerase in the clinical management of colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 2017;19:399-08.
9. Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, et al. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:1238-50.
10. Seow WJ, Cawthon RM, Purdue MP, et al. Telomere length in white blood cell DNA and lung cancer: a pooled analysis of three prospective cohorts. *Cancer Res* 2014;74:4090-8.
11. Wang H, Wang Y, Kota KK, et al. Strong association between long and heterogeneous telomere length in blood lymphocytes and bladder cancer risk in Egyptian. *Carcinogenesis* 2015;36:1284-90.
12. Hosnijeh FS, Matullo G, Russo A, et al. Prediagnostic telomere length and risk of B-cell lymphoma. Results from the EPIC cohort study. *Int J Cancer* 2014;135:2910-7.
13. Xie H, Wu X, Wang S, et al. Long telomeres in peripheral blood leukocytes are associated with an increased risk of

- soft-tissue sarcoma. *Cancer* 2013;119:1885-91
14. Suraweera N, Mouradov D, Li S, et al. Relative telomere lengths in tumour and normal mucosa are related to disease progression and chromosome instability profiles in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7:36474-88.
  15. Low KC, Tergaonka V. Telomerase: Central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci* 2013;38:426-34.
  16. Blackburn EH, Greide CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006;12:1133.
  17. Kim NW, Piatsyzek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.
  18. Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 2011;21:349-53.
  19. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997;276:561-7.
  20. Zhu J, Zhao Y, Wang S. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein Cell* 2010;1:22-32.
  21. Zhou LN, Hua X, Deng WQ, et al. PCDH10 Interacts with hTERT and negatively regulates telomerase activity. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e2230.
  22. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, et al. Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma- the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109:807-13.
  23. Li Z, Chim JC, Yang M, et al. Role of PCDH10 and its hypermethylation in human gastric cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823: 298-305.
  24. Tang X, Yin X, Xiang T, et al. Protocadherin 10 is frequently downregulated by promoter methylation and functions as a tumour suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 2012;12:11-9.
  25. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press: Lyon 2000.
  26. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-54.
  27. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e47.
  28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) method. *Methods* 2001;25:402-8.
  29. Lathia JD, Liu H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Target Oncol* 2017;12:387-99.
  30. Shukla S, Meeran SM. Epigenetics of cancer stem cells: pathways and therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:3494-502.
  31. DeHart CJ, Chahal JS, Flint SJ, et al. Extensive post-translational modification of active and inactivated forms of endogenous p53. *Mol Cell Proteomics* 2014;13:1-17.
  32. Eichelmann AK, Matuszcak C, Hummel R, et al. Role of miRNAs in cell signaling of cancer associated fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;101:94-102.
  33. Strzelczyk JK, Krakowczyk L, Owczarek AJ. Aberrant DNA methylation of the p16, APC, MGMT, TIMP3 and CDH1 gene promoters in tumours and the surgical margins of patients with oral cavity cancer. *J Cancer* 2018;9:1896-904.
  34. Terali K, Yilmazer A. New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness. *Biochimie* 2016;121:170-8.
  35. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* 2016;8:69.
  36. Shoji Y, Yoshinaga K, Inoue A, et al. Quantification of telomerase activity in sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:1304-9.
  37. Kanamaru T, Tanaka K, Kotani J, et al. Telomerase activity and hTERT in development and progression of adenoma to colorectal cancer. *Int J Mol Med* 2002;10:205-10.
  38. Tahara H, Yasui W, Tahara E, et al. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in colorectal tumour and non-tumour tissue sections. *Oncogene* 1999;18:1561-7.
  39. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, et al. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumours and tumour-derived cell lines. *Nat Med* 1997;3:1271-4.
  40. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 2010;11:319-30.
  41. Krams M, Claviez A, Heidorn K, et al. Regulation of telomerase activity by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas. *Am J Pathol* 2001;159:1925-32.
  42. Barczak W, Suchorska WM, Sobocka A, et al. hTERT C250T promoter mutation and telomere length as a molecular markers of cancer progression in patients with head and neck cancer. *Mol Med Rep* 2017;16:441-6.
  43. Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, et al. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol* 2013;14:534-42.
  44. Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, et al. Non-clustered protocadherin. *Cell Adhes Migr* 2011;5:97-105.
  45. Ying J, Li H, Seng TJ, et al. Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumour suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation. *Oncogene* 2006;25:1070-80.
  46. Yu J, Cheng YY, Tao Q, et al. Methylation of protocadherin 10, a novel tumour suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastroenterology* 2009;136:640-51.
  47. Xu Y, Yang Z, Yuan H, et al. PCDH10 inhibits cell proliferation of multiple myeloma via the negative regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin/BCL-9 signaling pathway. *Oncol Rep* 2015;34:747-54.
  48. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, et al. Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma- the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109: 807-13.
  49. Fernández-Marcelo T, Sánchez-Pernaute A, Pascua I, et al. Clinical relevance of telomere status and telomerase activity in colorectal cancer. *PLoS One* 2016;11:e0149626.
  50. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, et al. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346: 866-8.
  51. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, et al. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3: 1931-41.
  52. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:1807-14.
  53. Radpour R, Barekati Z, Haghghi MM, et al. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation

- profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol* 2010;23:763-2.
54. Kammori M, Sugishita Y, Okamoto T, et al. Telomere shortening in breast cancer correlates with the pathological features of tumour progression. *Oncol Rep* 2015;34:627-32.
  55. Wu X, Tanaka H. Aberrant reduction of telomere repetitive sequences in plasma cell-free DNA for early breast cancer detection. *Oncotarget* 2015;6:29795–807.
  56. Idei T, Sakamoto H, Yamamoto T. Terminal restriction fragments of telomere are detectable in plasma and their length correlates with clinical status of ovarian cancer patients. *J Int Med Res* 2002;30:244–50.

## Procalcitonin levels in Sjögren syndrome

**Bahar Arican Tarim<sup>1</sup>, Mehmet Engin Tezcan<sup>2</sup>, Asuman Orcun<sup>3</sup>, Mehmet Aliustaoglu<sup>1</sup>, Ozcan Keskin<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, University of Health Sciences, Kartal Dr. Lutfi Kirdar Training and Research Hospital, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Department of Rheumatology, University of Health Sciences, Kartal Dr. Lutfi Kirdar Training and Research Hospital, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Health Sciences, Kartal Dr. Lutfi Kirdar Training and Research Hospital, Istanbul, Turkey

### ABSTRACT

**Background:** procalcitonin (PCT) is a polypeptide secreted as a response to a bacterial stimulus. PCT serum concentrations are increased also in some autoimmune diseases. At the best of our knowledge, there is no study in literature that evaluated PCT values in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). The aim of this paper is to measure PCT values in pSS and to determine if these are related to the disease activity.

**Methods:** this is a case-control study. Two groups of subjects were included: 48 patients with pSS, who met American College of Rheumatology 2012 Classification Criteria for Sjögren's syndrome and 53 healthy subjects as control group (without any acute or chronic disease). The subjects with possible infectious disease were excluded on the basis of their clinical evaluation and laboratory data. Serum PCT values were measured by electrochemiluminometric method. PCT values have been compared between the groups; the correlation between disease activity, measured by Sjögren's syndrome disease activity index (SSDAI) and PCT levels was evaluated.

**Results:** PCT values in pSS group were within the reference range, but significantly higher than those measured in the control group [median (interquartile range) values were 0.036 ng/mL (0.031-0.044) and 0.020 ng/mL (0.020-0.020) respectively], ( $p < 0.001$ ). No correlation was found between disease activity and PCT values ( $p = 0.63$ ).

**Conclusions:** on the basis of the presented results, PCT could be a candidate marker for differentiating disease activity from the presence of an infection in pSS patients. Future studies in pSS patients with infectious diseases could possibly demonstrate the role of PCT in this context.

### INTRODUZIONE

Procalcitonin (PCT) is a polypeptide secreted as a response to a bacterial stimulus. It is considered and used in clinical practice as an early and sensitive marker of infection (1). It was shown that endotoxins, cytokines and bacterial lipopolysaccharides are strong stimulators of PCT excretion. In healthy subjects, PCT is usually  $< 0.1$  ng/mL and in case of infection a rise over 0.5 ng/mL could be observed (1).

PCT values might also increase in inflammatory diseases without concomitant infection; however, in inflammatory diseases the PCT plasma concentration usually does not reach the values measured in infections (2-6).

In the rheumatology field, a number of studies have

investigated the PCT levels in autoimmune diseases (2-20). The results suggest that in some autoimmune diseases, a certain amount of increase in PCT levels can be observed despite a lack of concomitant infections. The differential diagnosis between infection and disease activation is important in autoimmune diseases. Several studies have evaluated the role of PCT in excluding infection from disease activity (7, 10, 18-20). At the best of our knowledge, there is no study in the English literature concerning PCT values in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and evaluating whether PCT values can be used to differentiate disease activation from infection in these patients.

The aim of this study is to compare PCT values in pSS patients with a group of healthy controls and to evaluate the possible correlation levels and disease activity.

Corrispondenza a: Mehmet Engin Tezcan, MD., Kartal Dr. Lutfi Kirdar Training and Research Hospital, Department of Rheumatology, Kartal, 34680, Istanbul-Turkey, Tel +902164583000, E-mail engintez@yahoo.com

Ricevuto: 27.11.2018

Revisionato: 04.02.2019

Accettato: 10.02.2019

Publicato on-line: 16.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.020

## METHODS

48 patients with pSS were enrolled in the study. Patients were admitted to Dr. Lutfi Kirdar Kartal Training and Research Hospital, Istanbul (Turkey) rheumatology outpatient clinic in one year period from June 2016 to June 2017. All patients met the 2012 criteria of the American College of Rheumatology for classification of Sjögren's Syndrome (21). 53 healthy subjects, without any acute or chronic diseases were appointed as control group. All the subjects were referred to the Internal Medicine outpatient clinic of the same hospital for a routine check-up. Patients and controls were matched for age, sex and educational level.

Patients and controls were evaluated for the presence of infection on the basis of their medical history and physical examination. Subjects with active infection or those with clinical suspicion of infection were excluded. Patients with other autoimmune disease or chronic inflammatory diseases, or who had a history of surgery or hospitalization in the last few months, or were using antibiotics at the time of the study were also excluded.

The patients underwent complete physical examination and laboratory tests including complete blood count (CBC), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine, erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein, urine analyses and PCT. PCT concentrations were assessed in serum samples and measured by Roche Modular E-170 device by an electrochemiluminometric immunoassay within 24 hours from the blood collection. During the first incubation a biotinylated monoclonal PCT specific antibody and a monoclonal PCT specific antibody labeled with a ruthenium complex react with PCT to form a sandwich complex. After addition of streptavidin-coated microparticles, the complex binds to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin. Microparticles are then magnetically captured onto the surface of the electrode and unbound substances are removed with a wash solution. Application of a voltage to the electrode induces chemiluminescent emission that is measured by a photomultiplier. PCT concentrations are finally determined via a calibration curve. The analytical sensitivity of the method is  $\leq 0.02$  ng/mL; the functional sensitivity is 0.06 ng/mL.

Disease activity was calculated by Sjögren's Syndrome disease activity index (SSDAI) (22). The two groups were matched according to their educational level for ensuring the reliability of the patient-based items in SSDAI.

The study obtained the approval from the local ethic committee and it has been carried out as per the Helsinki declaration as revised in 1996. All the participants gave informed consent before they were included in the study.

## Statistical analyses

Statistical analyses were carried out by SPSS (17.0, Chicago, IL, USA) program. Distribution of numerical

variables was evaluated by Kolmogorov-Smirnov test. All categorical variables were non-normally distributed. Numerical variables were compared with Mann-Whitney U test; Chi-square test was used to compare categorical variables. Numerical variables were summarized by median (interquartile range) values. The presence of correlation between PCT and disease activity was determined by Spearman's correlation coefficient. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

A total of 101 participants were included in this study; 48 of them were patients with pSS. PCT level was found statistically higher in pSS group ( $p < 0.001$ ). However, none of the pSS patients had PCT value higher than 0.1 ng/mL; unlike, one subject in the control group had PCT value higher than 0.1 ng/mL. Furthermore, patients with pSS had higher creatinine levels and lower platelets levels as compared to the controls ( $p = 0.02$ ). However, creatinine and platelets of all subjects were within the reference range. All other demographic and laboratory parameters did not differ between the two groups (Table 1). None of the patients had extra glandular involvement at the time of the study. Moreover, all patients were on hydroxychloroquine and none were on steroids at the time of the study.

Furthermore, no correlation was detected between disease activity and PCT levels ( $p = 0.63$ ).

## DISCUSSION

In this study, the levels of PCT in pSS patients were compared with those measured in healthy subjects and the correlation of PCT blood concentration with disease activity was investigated. PCT levels were found higher in pSS patients; however, patient's PCT values were within the reference range and not correlated with disease activity.

In patient with autoimmune diseases, the differential diagnosis between infection and increased disease activity is generally difficult. Several studies investigating the contribution of PCT in differentiating disease activity from the infection are available (7, 10, 18-20).

Sato et al, report that PCT values in rheumatoid arthritis patients do not increase during acute exacerbation period. However, PCT levels increase significantly in these patients during bacterial infections (14).

Furthermore, it was shown that there was no correlation between the PCT levels and systemic lupus erythematosus disease activity. It was thus suggested that PCT values could be used to differentiate infection from disease activity in febrile patients (16).

In another study carried out in familial Mediterranean fever patients, PCT values increased non-significantly during attack period (20). Also in Behçet's disease, PCT blood concentrations did not differ between patients and healthy controls (7). It was also observed that PCT

**Table 1**  
Demographic characteristics and laboratory results of the subjects.

	Sjögren's disease patients (n=48)	Healthy control subjects (n=53)	p-value
Gender (M/F)	3/45	2/51	0.66
Age, years	53.50 (48.50 - 58.75)	50.00 (43.50 - 55.00)	0.04
SSDAI score	1.0 (1.00 - 2.00)	N/A	
Distribution of SSDAI, n (%)			
0	10 (20.8)		
1	18 (37.5)		
2	8 (16.6)		
3	5 (10.4)		
4	2 (4.1)		
4	2 (4.1)		
>5	3 (6.2)		
Domains of SSDAI, n (%)			
Fever	0 (0.0)		
Fatigue	32 (66.6)		
Change in fatigue	11 (26.5)		
Articular symptoms	36 (75.0)		
Cytopenia	0 (0.0)		
Lymphadenopathy/splenomegaly	4 (8.3)		
Vasculitis	0 (0.0)		
Renal involvement	0 (0.0)		
Peripheral neuropathy	0 (0.0)		
PCT, ng/mL	0.036 (0.031 - 0.044)	0.020 (0.020 - 0.020)	<b>&lt;0.001</b>
ESR, mm/h	22.0 (12.0 - 31.7)	18.0 (11.0 - 27.0)	0.13
CRP, mg/L	3.2 (3.2-3.2)	3.2 (3.1-3.2)	0.16
Hemoglobin, g/dL	12.5 (11.6 - 13.5)	12.8 (11.9 - 13.5)	0.82
Platelets (10 <sup>3</sup> /uL)	231 (189 - 278)	265 (226 - 304)	<b>0.02</b>
Leucocytes (10 <sup>3</sup> /uL)	6000 (5400 - 7200)	6700 (5450 - 8000)	0.15
Creatinine, mg/dL	0.66 (0.59 - 0.76)	0.57 (0.52 - 0.62)	<b>&lt;0.001</b>
ALT, U/L	18.5 (13.2 - 25.0)	18.0 (13.5 - 25.0)	0.74
AST, U/L	22.5 (19.0 - 25.0)	21.0 (17.5 - 25.5)	0.30

SSDAI, Sjögren's syndrome disease activity index; PCT, procalcitonin; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP; C-reactive protein; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase.  
Statistically significant P values were shown in bold.  
Continues variables were shown as median (interquartiles range).

values increased in active granulomatosis with polyangiitis and Still's disease, without presence of infection (4-6).

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) and interferons are main inducers of PCT secretion. TNF- $\alpha$  and IL-1 are not particularly increased in pSS, at odds with what is observed in infectious diseases; TNF is only moderately increased even in the active disease (22). These observations can explain why PCT values are within the reference range ( $<0.1$  ng/mL) in our pSS patients and only slightly higher than the values observed in the control group.

Even if platelet count is lower and creatinine concentrations are significantly higher in pSS patients than in control group, these parameters are within the reference range in both groups. The reasons for these differences could be attributable to drug side effects or disease related autoimmune phenomena.

Our study was mainly designated to evaluate whether the disease activity correlates with PCT values. We did not find any correlation between SSDAI score and the PCT levels. Also, considering that none of the pSS patient show extraglandular involvement, we can conclude that PCT concentrations do not increase with disease activity in our pSS patients. This is probably due to the difference of cytokine expression between bacterial infections and pSS, especially during active disease state. Future studies that evaluate PCT levels in pSS patients with infection could demonstrate the effectiveness of PCT as a reliable marker for screening infection diseases and follow up the treatment response to bacterial infection in pSS.

Functional analytical sensitivity of the kit we used was 0.06 ng/mL. Both patients and controls' median and third quartile PCT values were lower than 0.06 ng/mL. Therefore, the clinical significance of the difference in PCT values between the groups, is unclear even it was statistically significant.

Limitations of this study are the small sample size and lack of Sjögren's disease patient with extraglandular manifestations.

Future studies including pSS patients with extraglandular involvement and pSS patients with infectious diseases could give more information about the role of PCT in differentiating disease activity from infection in this patient group.

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## REFERENCES

- Oczenski W, Fitzgerald RD, Schwarz S. Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period. *Eur J Anaesthesiol* 1998;15:202-9.
- Buhaescu I, Yood RA, and Izzedine H. Serum procalcitonin in systemic autoimmune diseases-where are we now? *Semin Arthritis Rheum* 2010; 40:176-83.
- Chen DY, Chen YM, Ho WL, et al. Diagnostic value of procalcitonin for differentiation between bacterial infection and non-infectious inflammation in febrile patients with active adult-onset Still's disease. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1074-5.
- Korczowski B, Kowalczyk JR, Bijak M, et al. Concentration of procalcitonin and C-reactive protein in serum and erythrocyte sedimentation rate in active autoimmune diseases in children. *Pol Merkur Lekarski* 2003; 15: 155-7.
- Moosig F, Csernok E, Reinhold-Keller E, et al. Elevated procalcitonin levels in active Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 1998; 25:1531-3.
- Scire CA, Cavagna L, Perotti C, et al. Diagnostic value of procalcitonin measurement in febrile patients with systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24:123-8.
- Adam B and Calikoglu E. Serum interleukin-6, procalcitonin and C-reactive protein levels in subjects with active Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:318-20.
- Bador KM, Intan S, Hussin S, et al. Serum procalcitonin has negative predictive value for bacterial infection in active systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012; 21: 1172-7.
- Brunkhorst R, Eberhardt OK, Haubitz M, et al. Procalcitonin for discrimination between activity of systemic autoimmune disease and systemic bacterial infection. *Intensive Care Med* 2000; 26, Suppl 2: S199-201.
- Eberhard OK, Haubitz M, Brunkhorst FM, et al. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1250-6.
- Kim HA, Jeon JY, An JM, et al. C-reactive protein is a more sensitive and specific marker for diagnosing bacterial infections in systemic lupus erythematosus compared to S100A8/A9 and procalcitonin. *J Rheumatol* 2012; 39:728-34.
- Lanoix JP, Bourgeois AM, Schmidt J, et al. Serum procalcitonin does not differentiate between infection and disease flare in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20:125-30.
- Quintana G, Medina YF, Rojas C, et al. The use of procalcitonin determinations in evaluation of systemic lupus erythematosus. *J Clin Rheumatol* 2008; 14(3): 138-42.
- Sato H, Tanabe N, Murasawa A, et al. Procalcitonin is a specific marker for detecting bacterial infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2012; 39: 1517-23.
- Scire CA, Caporali R, Perotti C, et al. Plasma procalcitonin in rheumatic diseases. *Reumatismo* 2003; 55:113-8.
- Serio I, Arnaud L, Mathian A, et al. Can procalcitonin be used to distinguish between disease flare and infection in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic literature review. *Clin Rheumatol* 2014; 33:1209-15.
- Wang C, Zhong D, Liao Q, et al. Procalcitonin levels in fresh serum and fresh synovial fluid for the differential diagnosis of knee septic arthritis from rheumatoid arthritis, osteoarthritis and gouty arthritis. *Exp Ther Med* 2014;8: 1075-1080.
- Yoshikawa H, Nomura Y, Masuda K, et al. Serum procalcitonin value is useful for predicting severity of Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:523-5.
- Yu J, Xu B, Huang Y, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein for differentiating bacterial infection from disease activity in patients with systemic lupus

- erythematosus. *Mod Rheumatol* 2014;24:457-63.
20. Yuksel S, Ekim M, Ozcakar ZB, et al. The value of procalcitonin measurements in children with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2012;32:3443-7.
  21. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell L, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:475-87.
  22. Vitali C, Palombi G, Baldini C, et al. Sjogren's Syndrome Disease Damage Index and disease activity index: scoring systems for the assessment of disease damage and disease activity in Sjogren's syndrome, derived from an analysis of a cohort of Italian patients. *Arthritis Rheum* 2007;56:2223-31.

## Galectin-3 and Lp(a) plasma concentrations and advanced carotid atherosclerotic plaques: correlation with plaque presence and features

Daniela Palma<sup>1,2</sup>, Luisa Agnello<sup>3</sup>, Maria Donata Di Taranto<sup>1,2</sup>, Carola Giacobbe<sup>1,2</sup>, Marcella Savoia<sup>1</sup>, Antonio Travaglino<sup>4</sup>, Bruna Lo Sasso<sup>3</sup>, Luca del Guercio<sup>5</sup>, Umberto Marcello Bracale<sup>5</sup>, Marcello Ciaccio<sup>3,6</sup>, Giuliana Fortunato<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>2</sup>CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli

<sup>3</sup>Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo, Palermo

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>5</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>6</sup>Unità Operativa Complessa Medicina di laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria, Policlinico P. Giaccone, Palermo

### ABSTRACT

**Introduction:** atherosclerosis is one of the leading causes of death and morbidity worldwide. It consists in the development of plaques in the intima media layers of arteries due to lipid accumulation and oxidation, causing massive inflammation. We aim to better understand the role of Galectin-3 (Gal-3) and Lipoprotein(a) [Lp(a)] as possible peripheral markers of plaque presence.

**Methods:** Gal-3 and Lp(a) were measured in plasma samples from 99 patients undergoing carotid endarterectomy and 78 healthy controls, by immunometric assays. Plaques were classified histologically, according to the American Heart Association (AHA) guidelines as type Va (fibroatheroma), Vb (mainly calcific) and VI (complicated lesion).

**Results:** Gal-3 and Lp(a) plasma levels are higher in patients compared to controls [19.8 ng/mL (SD 5.8) vs 14.0 ng/mL (3.6)],  $p < 0.0001$  and 8.4 mg/dL (IQR 4.0-25.1) vs 4.7 mg/dL (2.4-12.7),  $p = 0.0003$ , respectively). Analysis of ROC curves confirmed the discriminating power of these markers obtaining an area under the curve of 0.806 ( $p < 0.0001$ ) for Gal-3 and 0.657 ( $p = 0.0001$ ) for Lp(a). At multivariate logistic regression, Gal-3 and Lp(a) plasma levels were associated with plaque presence independently of each other as well as of age, sex, LDL-C levels and previous myocardial infarction with an odds ratio of 1.22 (95%CI 1.08-1.38,  $p = 0.002$ ) and 1.05 (1.00-1.09,  $p = 0.048$ ) respectively. No differences of Gal-3 and Lp(a) plasma levels were observed among the plaque types.

**Conclusion:** our data showed that Gal-3 and Lp(a) are reliable markers of advanced atherosclerotic plaques. The absence of differences among the different lesion types suggests that the increase of Gal-3 and Lp(a) is independent of the specific plaque features.

### INTRODUCTION

Atherosclerosis is a progressive chronic inflammatory process of the arteries underlying several clinical conditions according to the artery involved. Carotid atherosclerosis represents an important risk factor for cerebrovascular ischemia leading to ischemic stroke, a major cause of morbidity and mortality in the developed countries (1, 2). The pathologic process leading to atherosclerosis is complex. It is commonly characterized

by an altered cellular permeability of the arterial walls and the focal sub-endothelial accumulation of LDL cholesterol (LDL-C), developing atherosclerotic plaques characterized by inflammation and oxidation (3, 4). The presence of oxidized LDL-C particles in the sub-endothelial space of the interstitial arteries is described as the crucial event for the formation of foam cells and induction of inflammatory response (5). Studies on the lipid component present in atherosclerotic lesions showed that another class of lipoproteins, the

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

Ricevuto: 14.01.2019

Revisionato: 25.01.2019

Accettato: 05.03.2019

Publicato on-line: 10.06.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.025

lipoprotein (a) [Lp(a)] may be involved in the formation and progression of atherosclerotic plaques. Lp(a) is a modified LDL particle with the apolipoprotein (a) [Apo(a)], covalently attached to apolipoprotein B-100 of LDL particle by a single thioester bond. The physiological functions of Lp(a) are still unknown. Similarly to other lipoproteins, Lp(a) is also susceptible to oxidative modifications, leading to extensive formation of pro-inflammatory and pro-atherogenic oxidized phospholipids, oxysterols lipid-protein adducts in Lp(a) particles (6). Moreover, Apo(a) has several kringle domains rich in disulfide bridges similar to many coagulation and fibrinolysis proteins. In particular, a strong homology between Apo(a) and plasminogen has been demonstrated and different studies suggest that Apo(a) is able to inhibit, by a competitive inhibition mechanism, the binding of plasminogen to its receptor, thereby interfering with fibrinolysis and inducing a prothrombotic status (7). It may be inferred that Lp(a) is able both to amplify oxidative stress and inflammation-related atherogenesis and to stimulate prothrombotic mechanisms leading to acute events such as stroke or acute myocardial infarction (AMI). Lp(a) plasma levels show a significant inter-individual variability as they are inversely related to the Apo(a) size that is genetically determined (8). There are several forms of Apo(a) based on the repetition number of the kringle IV type 2 domain. A low repetition number (i.e. a small Apo(a) molecule) is associated with high Lp(a) circulating concentrations (9).

Despite its well-known atherogenic role, Lp(a) could be considered a re-emerging risk factor for cardiovascular disease since the previous methodologies were unable to measure all the Lp(a) length forms. Recently, available methods based on antibodies recognizing the fixed region of the protein, have improved the accuracy of the assays, being able to measure the Lp(a) containing Apo(a) with different lengths (10).

Inflammation is the main process involved in the development of atherosclerotic plaque and macrophages play a pivotal role through the synthesis and secretion of pro-inflammatory mediators including cytokines and matrix metalloproteinase (11). Several molecules involved in pathobiology of atherogenesis as well as some genetic conditions have been investigated over the years attempting to identify their role as markers or predictors of cardiovascular diseases (12-15). Galectin-3 (Gal-3) is a  $\beta$ -galactoside-binding lectin belonging to the Galectin family secreted by macrophages (16). Once secreted, Gal-3 acts in an autocrine way activating macrophages and other inflammatory cells and promoting the migration of monocytes into vascular walls. It is a multifunctional, pleiotropic protein involved in several biological processes among which macrophage chemotaxis, phagocytosis, oxidative stress, cell proliferation, and deposition of type-1 collagen in the extracellular matrix (ECM) (17). It is ubiquitously expressed and, although it is predominantly located in the cytoplasm, it has also

been detected in the nucleus, on the cell surface and in the circulation (16). Circulating Gal-3 levels significantly increase under several pathological conditions such as AMI, heart failure, acute coronary syndrome, cancer and renal diseases (18-21). Upregulation of Gal-3 has been described both in rodent models of atherosclerotic disease and human atherosclerotic lesions (22). The majority of animal studies have consistently indicated the correlation between Gal-3 plaque levels and atherosclerosis development (23, 24). In vitro studies suggested that Gal-3 could promote the migration of monocytes into vascular walls (22). Other studies reported that Gal-3 is correlated with matrix metalloproteinases which play an important role in plaque destabilization (25) and modulates vascular calcification (26). However, few clinical studies have been performed to assess the role of Gal-3 as a circulating marker of atherosclerotic plaque presence and features.

The aim of this study was to investigate the association of Lp(a) and Gal-3 plasma levels with the presence of carotid atherosclerotic plaque and identify possible differences between the different plaque types in a population of patients undergoing carotid endarterectomy.

## METHODS

### Study population

We enrolled 99 consecutive patients undergoing carotid endarterectomy for stenosis  $\geq 70\%$  or stenosis ranging from 50% to 70% associated to clinical symptoms according to the American Heart Association (AHA) guidelines. Patients were enrolled at the Department of Public Health (Vascular Surgery Unit) of the University of Naples Federico II. Physiological, pathological and anamnestic data were collected for each patient. The gathered data included age, body mass index (BMI) calculated dividing the weight (kg) by the height squared meters, and cardiovascular risk factors including arterial hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, obesity, smoking and previous AMI. Patients were considered hypertensive if they had systolic blood pressure  $>140$  mmHg and/or diastolic blood pressure  $>90$  mmHg or were receiving anti-hypertension therapy. Diabetes mellitus was defined as non-fasting glucose  $>10.5$  mmol/L, fasting plasma glucose  $>6.9$  mmol/L and/or glycosylated hemoglobin  $>47.5$  mmol/L, treatment for diabetes mellitus, or self-reported physician diagnosis of diabetes mellitus. Dyslipidemia was defined according to the American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology Guidelines (27) or if patients were under treatment with statins or fibrates. Patients were defined as obese if their BMI was  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Smokers were classified as current smokers or ex-smokers ( $>100$  cigarettes in their lifetime but not in the last 28 days). Symptomatic patients were defined as those having a history of ischemic stroke, transient

ischemic attack or amaurosis fugax.

We recruited, also, 78 healthy blood donors as controls from a previous study (28).

The study was performed according to the current version of the Helsinki Declaration and informed consent was obtained for each patient.

### Biochemical analysis

Lipid parameters including total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides, as well as Lp(a) and Gal-3 were measured on plasma of patients and controls. Since high Gal-3 levels could be due to cardiac fibrosis, we firstly verified that this condition was not present in our population. Then, to rule out any recent cardiac damage, we also measured brain natriuretic peptide (BNP) and high sensitivity troponin I (hsTnI), which were both found within the reference ranges. In addition, to exclude the presence of renal failure as an additional cause of increased Gal-3 levels, we verified that the levels of urea and creatinine were within the reference intervals. Patients' blood samples were collected in a tube with EDTA before undergoing carotid endarterectomy. Plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes and subsequently frozen in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  until testing. Plasma from control subjects was obtained as previously described (28).

Lipid parameters were measured by enzymatic colorimetric method on the ARCHITECT i2000R System (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). LDL-C levels were calculated by the Friedewald formula. Gal-3, BNP and hsTnI plasma levels were measured by chemiluminescent microparticle immunoassay on the ARCHITECT i1000R System (Abbott). Lp(a) plasma levels were measured by particle enhanced immunonephelometry on the BN ProSpec System (Siemens). All measurements were performed on the same plasma sample.

### Histopathological analysis of carotid plaques

Surgically removed carotid plaques were collected from patients as previously described (29). Each endarterectomy specimen was immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and stored at the biobank of CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate.

Carotid plaques were histologically stained with hematoxylin-eosin according to the AHA guidelines (30, 31). Briefly, plaques were classified as type IV (atheroma), Va (fibroatheroma), Vb (mainly calcific) and VI (complicated lesion).

Histopathological analysis was performed at the Department of Advanced Biomedical Sciences of the University of Naples Federico II by an experienced pathologist at a two-headed microscope together with a second pathologist.

### Statistical Analysis

The normality of variables distribution was evaluated

using Kolmogorov-Smirnov test. Parametric variables are reported as mean (standard deviation, SD); non parametric variables are reported as median and interquartile range (IQR). T-test, Mann-Whitney, ANOVA and Kruskal-Wallis were used to compare data between groups. Fisher exact test was used to evaluate frequency differences of sex and AMI between patients and controls. For multivariate logistic regression, the Odds Ratio (OR) and the related 95% Confidence Interval (95%CI) were reported. Sex was codified as 0(male) or 1(female), whereas AMI was codified as 0(no AMI) or 1(AMI).

Data were analyzed using Predictive Analytics SoftWare 18.0 (SPSS Inc.). The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was performed by MedCalc version 11.5.1. Area Under the Curve (AUC) values were reported with the 95%CI and the significance level was calculated against the null hypothesis  $\text{AUC} = 0.5$  using the DeLong method. The optimal threshold values for Lp(a) and Gal-3 were determined by the farthest point from the bisector of the ROC curve. The Hanley & McNeil test was used to compare the AUCs of Gal-3 and Lp(a). A p value  $<0.05$  was considered significant.

### RESULTS

This study included a total of 177 subjects, 99 patients with stenosis of the carotid artery undergoing carotid endarterectomy and 78 healthy controls. Demographic, clinical and biochemical characteristics of patients and controls are shown in Table 1.

The Gal-3 and Lp(a) plasma values were significantly higher in patients than in controls, whereas the LDL-C levels were lower in patients compared to controls as showed in Table 1.

The discriminating power of Gal-3 and Lp(a) was assessed by ROC curves analysis, showing that both Gal-3 and Lp(a) plasma concentrations identify the presence of carotid atherosclerosis with high accuracy (Figure 1). The best thresholds to distinguish between patients and controls and their respective sensitivity and specificity are indicated in Figure 1.

Plasma Gal-3 is a better parameter than Lp(a) to distinguish atherosclerotic patients from controls ( $p = 0.003$  at the comparison of ROC curves).

We observed that the values of Gal-3 and Lp(a) did not statistically differ between patients with a previous AMI ( $n = 17$ ) and patients without AMI ( $n = 82$ ). The Gal-3 plasma concentrations were 20.3 ng/mL (SD 7.3) versus 19.7 ng/mL (5.5),  $p = 0.701$ ; the Lp(a) plasma concentrations were 12.3 mg/dL (IQR 4.1-28.1) versus 8.1 mg/dL (3.9-24.6),  $p = 0.985$ .

To evaluate the association of Gal-3 and Lp(a) with the presence of atherosclerotic plaques independently of age, sex, LDL-C and AMI, we performed a multivariate logistic regression analysis. Although no differences of gender frequency were observed we decided to include this parameter in the multivariate model in order to verify

**Table 1**  
Demographic, clinical and biochemical characteristics of patients and controls.

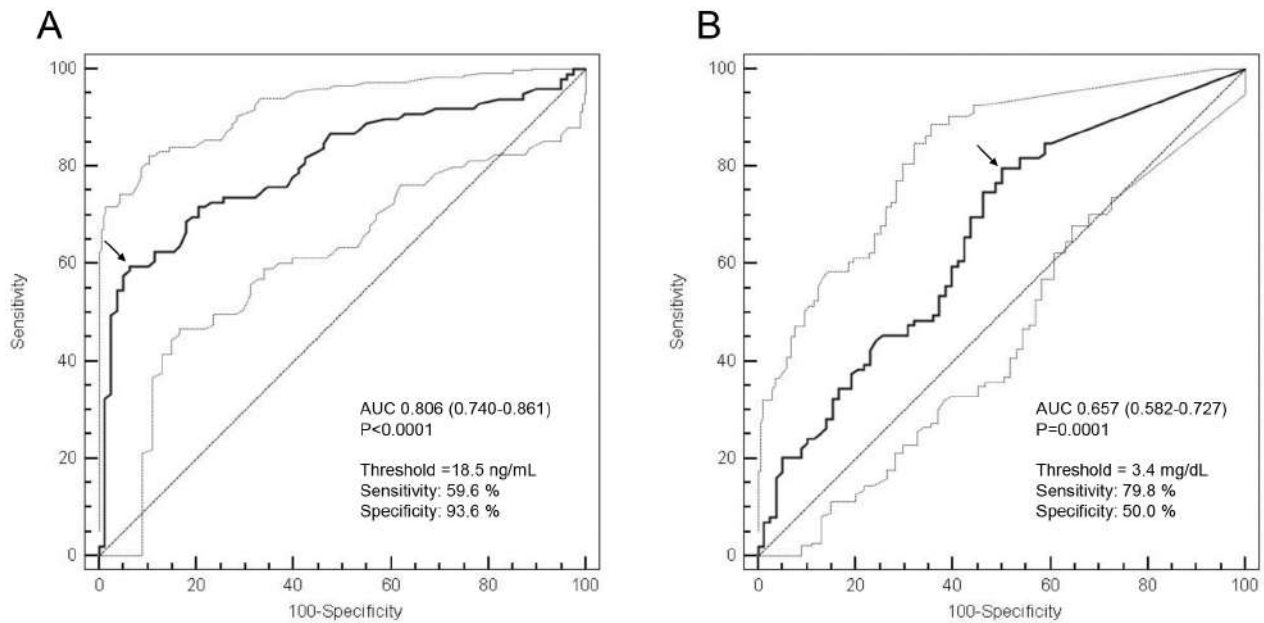
	Patients (n=99)	Controls (n=78)	p value
Age, years	71 (63-76)	61 (60-63)	<0.0005
Gender, n male	70	56	1.000
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26.9 (4.2)	n.a.	
Arterial hypertension, n	83	n.a.	
Diabetes, n	40	n.a.	
Dyslipidaemia, n	73	n.a.	
Obesity, n	21	n.a.	
Smoking, n	42	n.a.	
Acute myocardial infarction, n	17	0	<0.0001
High sensitivity Troponin I, pg/mL	3.3 (2.5-4.8)	2.8 (2.2-3.9)	0.057
Brain natriuretic peptide, pg/mL	10.0 (10.0-19.7)	10.0 (10.0-18.1)	0.954
Glucose, mmol/L	5.22 (4.55-6.1)	5.11 (4.72-5.49)	0.384
Total cholesterol, mmol/L	3.96 (1.03)	5.15 (0.68)	<0.0005
HDL-cholesterol, mmol/L	0.99 (0.28)	1.37 (0.30)	<0.0005
LDL-cholesterol, mmol/L	2.35 (0.82)	3.23 (0.61)	<0.0005
Triglycerides, mmol/L	1.22 (0.90-1.60)	1.12 (0.89-1.42)	0.186
Galectin-3, ng/mL	19.8 (5.8)	14.0 (3.6)	<0.0005
Lipoprotein(a), mg/dL	8.4 (4.0-25.1)	4.7 (2.4-12.7)	<0.001
Symptomatic, n	35		
Type of plaque,			
IV	2		
Va	11		
Vb	43		
VI	43		

Values are reported as mean (standard deviation); non parametric variables are reported as median (interquartile range); n.a. information not available

if the found associations were independent from this potential confounding factor. Among the lipid parameters differing between patients and controls, we included in the multivariate model only the LDL-C because a correlation between LDL-C and total cholesterol or HDL-C was observed. The Gal-3 and Lp(a) plasma levels remained significantly associated with plaque presence as shown in Table 2. We cannot include other clinical data (such as BMI, hypertension, diabetes, obesity, smoking) in the regression model because these information are lacking for the controls. However, among patients no association was found between Gal-3 or

Lp(a) levels and the presence of hypertension, diabetes, obesity or smoking.

Comparing Gal-3 and Lp(a) levels among the different plaque types, no differences were found. In fact, Gal-3 levels (ng/mL) were 13.9 and 23.1 in the 2 type IV plaques, 20.2 (3.2) in type Va, 20.4 (6.1) in type Vb and 19.3 (6.0) in type VI (p=0.810 at ANOVA), whereas Lp(a) levels (mg/dL) were 3.9 and 27.8 in the 2 type IV plaques, 12.3 (2.5-39.9) in type Va, 8.1 (4.0-22.5) in type Vb and 8.4 (5.2-24.5) in type VI (p=0.953 at Kruskal-Wallis). Moreover, no differences of Gal-3 and Lp(a) levels were found between complicated (type VI – Gal-3



**Figure 1**  
 ROC curves of Galectin-3 and Lipoprotein(a)  
 Panel A: ROC curve of Galectin-3; Panel B: ROC curve of Lipoprotein (a). The ROC curve is indicated with a bold line; the dotted lines indicate the 95% confidence interval (CI) and the bisector. The best threshold to separate patients and controls is indicated with an arrow. AUC: area under the curve

**Table 2**  
 Odds ratio obtained at multivariate logistic regression using the presence of atherosclerotic plaque as dependent variable.

Predictive variables	Significance	OR	95% CI for OR
Age	0.014	1.097	1.019-1.181
Gender	0.725	0.813	0.258-2.567
Lipoprotein(a)	0.048	1.045	1.000-1.091
Galectin-3	0.002	1.217	1.076-1.377
LDL-C	p<0.0005	0.945	0.922-0.968
AMI	0.998	0.000	

OR, Odds ratio; CI, Confidence Interval; LDL-C, LDL-cholesterol.

19.3 (6.0) and Lp(a) 8.4 (5.2-24.5)) and uncomplicated plaques (type IV, Va and Vb - Gal-3 20.3 (5.6), p=0.379 and Lp(a) 8.4 (3.8-26.5), p=0.972) or between symptomatic [Gal-3 18.6 (5.3) and Lp(a) 7.6 (3.3-24.5)]and asymptomatic patients (Gal-3 20.5 (6.0), p=0.115 and Lp(a) 8.5 (4.5-26.1), p=750.

**DISCUSSION**

In this study we analyzed the association of Gal-3 and Lp(a) plasma values with the presence of advanced

carotid atherosclerotic plaque. We found that patients with carotid plaque had higher levels of Gal-3 and Lp(a) than healthy controls.

Increased levels of Lp(a) are a well-known marker of cardiovascular events (32); as different results were obtained using different methods on the same sample, standardized methods were deemed necessary to measure all the Lp(a) length forms (33). The currently available methods allow to bypass the measurement differences among the length forms giving rise to a more accurate analysis of the association of Lp(a) levels to

cardiovascular diseases and acute events. Using a standardized method, we verified that Lp(a) levels alone are able to distinguish between patients with advanced plaque from healthy subjects.

We also observed that patients showed lower LDL-C levels than healthy controls; this could be due to the fact that patients were under statin therapy that influences LDL-C values but has a minor effect on Lp(a). As to Gal-3, there are several evidences demonstrating the association of its circulating levels with cardiovascular disease: Madrigal-Matute et al. found significantly higher Gal-3 levels in patients with carotid atherosclerosis in comparison with controls (34) and Ozturk et al. showed that circulating Gal-3 is a predictor of coronary atherosclerosis in patients with diabetes mellitus type 2 (35). Recently, increased Gal-3 circulating concentrations were found to be associated with high intima media thickness in patients with initial atherosclerosis (36) as well as with unfavorable outcomes after ischemic stroke (37). Our results are in agreement with the above mentioned findings. Since increased Gal-3 levels are associated with heart failure severity, cardiac fibrosis and renal dysfunction (21), we firstly verified that in our population no differences were present between patients with or without a previous AMI. Furthermore, to rule out any recent cardiac event or renal disease, we analyzed BNP, hsTnI, urea and creatinine in patient plasma. We concluded that the increased levels of Gal-3 cannot be attributed to these other pathological conditions.

The relationship between circulating Gal-3 and plaque characteristics has not been thoroughly investigated and only the correlation of high Gal-3 levels with calcified plaques (calcium score evaluated by imaging) was found (35). In our study, no differences of Gal-3 levels were observed among the different plaque types histologically assessed. The difference between our results and the latter study could be attributed to the different method used to evaluate plaque features. In addition, no differences were observed between complicated and uncomplicated plaques, suggesting that the increase of Gal-3 could be a marker of the various atherosclerotic lesion types.

We also observed that the association of Gal-3 and Lp(a) with plaque presence was independent of each other and of age, sex, LDL-C and previous AMI. In particular, the observed ORs indicate that increased levels of Gal-3 represent a risk factor more relevant than Lp(a) levels. Additional support to this datum was provided by the comparison of Gal-3 and Lp(a) ROC curves showing that Gal-3 is significantly more powerful in the discrimination between atherosclerotic patients and controls.

However, a limitation to the study is that we were unable to evaluate the role of several factors (BMI, hypertension, diabetes, obesity and smoking) on the association of Gal-3 and Lp(a) levels with plaque presence because this information about controls were lacking.

In conclusion, our findings suggest that high plasma

concentrations of both Gal-3 and Lp(a) are reliable biomarkers of advanced atherosclerotic plaque, independently of the specific plaque type.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the contribution of the Biobank of CEINGE and, in particular, of Dr. Annalisa Scotto di Frega for continued support of our work. This work was supported by MIUR funding under the project cod. PON03PE\_00060\_7, Italy.

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## REFERENCES

1. Barquera S, Pedroza-Tobias A, Medina C, et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res* 2015;46:328-38.
2. Guzik A, Bushnell C. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. *Continuum (Minneapolis)* 2017;23:15-39.
3. Fortunato G, Di Taranto MD. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta* 2007;381:21-5.
4. Di Taranto MD, Morgante A, Bracale UM, et al. Altered expression of inflammation-related genes in human carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2012;220:93-101.
5. Catapano AL, Pirillo A, Norata GD. Vascular inflammation and low-density lipoproteins: is cholesterol the link? A lesson from the clinical trials. *Brit J Pharmacol* 2017;174:3973-85.
6. Dube JB, Boffa MB, Hegele RA, et al. Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:133-40.
7. Hancock MA, Boffa MB, Marcovina SM, et al. Inhibition of plasminogen activation by lipoprotein(a) - Critical domains in apolipoprotein(a) and mechanism of inhibition on fibrin and degraded fibrin surfaces. *J Biol Chem* 2003;278:23260-9.
8. Kassner U, Schlabs T, Rosada A, et al. Lipoprotein(a) - An independent causal risk factor for cardiovascular disease and current therapeutic options. *Atherosclerosis Suppl* 2015;18:263-7.
9. Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein (a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology. *J Lipid Res* 2016;57:1953-75.
10. Marcovina SM, Albers JJ. Lipoprotein (a) measurements for clinical application. *J Lipid Res* 2016;57:526-37.
11. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity* 2017;47:621-34.
12. Acampa W, Di Taranto MD, Morgante A, et al. C-reactive protein levels are associated with paraoxonase polymorphism L55M in patients undergoing cardiac SPECT imaging. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:179-84.
13. Rubba P, Gentile M, Marotta G, et al. Causative mutations and premature cardiovascular disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Prev Cardiol* 2017;24:1051-9.
14. Tibaut M, Caprnda M, Kubatka P, et al. Markers of Atherosclerosis: Part 1 - Serological Markers. *Heart Lung Circul* 2018;28:667-77.

15. Agnello L, Bivona G, Novo G, et al. Heart-type fatty acid binding protein is a sensitive biomarker for early AMI detection in troponin negative patients: a pilot study. *Scand J Clin Lab Inv* 2017;77:428-32.
16. Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci* 2018;19:pii:E379.
17. Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, et al. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue antigens*. 2004;64:1-12.
18. Bivona G, Bellia C, Lo Sasso B, et al. Short-term Changes in Gal 3 Circulating Levels After Acute Myocardial Infarction. *Arch Med Res* 2016;47:521-5.
19. Gehlken C, Suthahar N, Meijers WC, et al. Galectin-3 in Heart Failure: An Update of the Last 3 Years. *Heart Fail Clin* 2018;14:75-92.
20. Agnello L, Bivona G, Lo Sasso B, et al. Galectin-3 in acute coronary syndrome. *Clin Biochem* 2017;50:797-803.
21. Dong R, Zhang M, Hu Q, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* 2018;41:599-614.
22. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, et al. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:433-40.
23. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol* 2008;172:247-55.
24. MacKinnon AC, Liu XJ, Hadoke PWF, et al. Inhibition of galectin-3 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Glycobiology* 2013;23:654-63.
25. Lin YH, Lin LY, Wu YW, et al. The relationship between serum galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in heart failure patients. *Clin Chim Acta* 2009;409:96-9.
26. Menini S, Iacobini C, Ricci C, et al. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2013;100:472-80.
27. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease. *Endocr Pract* 2017;23:1-87.
28. Agnello L, Bellia C, Lo Sasso B, et al. Establishing the upper reference limit of Galectin-3 in healthy blood donors. *Biochem Med (Zagreb)* 2017;27:030709.
29. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, et al. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:594-600.
30. Stry HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994;14:840-56.
31. Stry HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1512-31.
32. Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, et al. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* 2009;302:412-23.
33. Rifai N, Ma J, Sacks FM, et al. Apolipoprotein(a) size and lipoprotein(a) concentration and future risk of angina pectoris with evidence of severe coronary atherosclerosis in men: The Physicians' Health Study. *Clin Chem*.2004;50:1364-71.
34. Madrigal-Matute J, Lindholt JS, Fernandez-Garcia CE, et al. Galectin-3, a biomarker linking oxidative stress and inflammation with the clinical outcomes of patients with atherothrombosis. *J Am Heart Assoc* 2014;3:pii:e000785.
35. Ozturk D, Celik O, Satilmis S, et al. Association between serum galectin-3 levels and coronary atherosclerosis and plaque burden/structure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Coronary Artery Dis* 2015;26:396-401.
36. Oyenuga A, Folsom AR, Fashanu O, et al. Plasma Galectin-3 and Sonographic Measures of Carotid Atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Angiology* 2018;3319718780772.
37. He XW, Li WL, Li C, et al. Serum levels of galectin-1, galectin-3, and galectin-9 are associated with large artery atherosclerotic stroke. *Sci Rep* 2017;7:40994.

## Medicina di Laboratorio e Medicina d'Urgenza: il connubio continua

Giuseppe Lippi<sup>1</sup>, Laura Bonfanti<sup>2</sup>, Ivo Casagrande<sup>3</sup>, Mario Cavazza<sup>4</sup>, Aldo Clerico<sup>5</sup>, Davide Giavarina<sup>6</sup>,  
Martina Montagnana<sup>1</sup>, Paola Pauri<sup>7</sup>, Erica Rampoldi<sup>8</sup>, Marcello Tavio<sup>9</sup>, Tommaso Trenti<sup>10</sup>, Gianfranco Cervellin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

<sup>2</sup>Unità Operativa di Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza, Dipartimento Interaziendale Provinciale Emergenza-Urgenza della Provincia di Parma, Parma, Italia

<sup>3</sup>Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC), Pavia, Italia

<sup>4</sup>Unità Operativa di Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso, Azienda Ospedaliero-Universitaria Di Bologna, Bologna, Italia

<sup>5</sup>Scuola Superiore Sant'Anna e Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio, Pisa, Italia

<sup>6</sup>Laboratorio Analisi, AULSS 8 Berica, Vicenza, Italia

<sup>7</sup>Patologia Clinica Area Vasta 2, Presidio Ospedaliero Unico - Ospedale Carlo Urbani, Jesi

<sup>8</sup>Unità Operativa Laboratorio Analisi, Presidio Ospedaliero di Legnano, ASST Ovest M, Legnano, Italia

<sup>9</sup>Malattie Infettive Emergenti e degli Immunodepressi, Azienda Ospedaliero Universitaria "Ospedali Riuniti", Ancona, Italia

<sup>10</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Ospedale S. Agostino Estense, Modena, Italia

### ABSTRACT

**Laboratory medicine and emergency medicine: a perpetual relationship.** The essential goals that laboratory medicine shall pursue to adequately fulfill clinical needs can be summarized in delivering high quality information, availability of clinically usable tests and turnaround time. The governance of urgent laboratory testing encompasses a harmonious integration of clinical needs and laboratory organization. Clinical laboratories shall hence be more focused on the pre-preanalytical phase, be involved in proactive efforts for standardizing pre-analytical and analytical procedures, optimize the post-analytical and post-post-analytical phases, thus providing a complete information and allowing the achievement of favorable outcomes. Throughout this ample and multifaceted process, the strict cooperation between laboratory professionals and emergency physicians is pivotal. As rationale follow-up of the collective article published concomitantly with the first joint Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) - Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) meeting, this new collective paper aims to summarize the topics discussed during the second joint event "Laboratory Medicine and Emergency Medicine: a resumed link", specifically including the governance of urgent tests, acid-base disorders, venous thromboembolism, acute heart failure, trauma, acute intoxications, viral diseases and other emerging infections.

### INTRODUZIONE

La medicina di laboratorio è tradizionalmente definita come una scienza orientata a produrre informazioni clinicamente utili mediante analisi quantitativa o qualitativa di analiti nei liquidi biologici (1). Il reale contributo che gli esami di laboratorio possono offrire al ragionamento diagnostico ed alla gestione clinica del paziente è ancora oggi oggetto di acceso dibattito. Alcune affermazioni, basate sull'ipotesi che il laboratorio possa contribuire fino al 70% delle decisioni cliniche, non

trovano un sostanziale fondamento nella pratica clinica. Pur concordando che la maggior parte delle decisioni cliniche si basano comunque su informazioni trasmesse dal laboratorio, è altresì innegabile che in alcuni ambiti gli esami diagnostici rivestano una importanza maggiore che in altri, rappresentando di fatto il cardine del processo decisionale (ad esempio nella diagnostica dell'infarto acuto del miocardio o del diabete) (1). Fa da contraltare alla definizione di medicina di laboratorio quella di medicina d'urgenza, intesa come specialità medica orientata alla diagnosi e al trattamento di

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

Ricevuto: 18.01.2019

Accettato: 31.01.2019

Pubblicato on-line: 03.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.017

patologie "impreviste" (2). La necessità di formulare una diagnosi rapida ed accurata, seguita da un trattamento appropriato, rappresentano pertanto il paradigma della medicina d'urgenza. Ciò richiede un sostanziale adattamento delle discipline diagnostiche, come la medicina di laboratorio, le quali sono portate a modificare la loro organizzazione per implementare esami rapidi, caratterizzati da un'elevata accuratezza diagnostica, che consentano ai medici d'urgenza di formulare una diagnosi precoce o, altrettanto rapidamente, di escluderne un'altra. Questi requisiti essenziali possono essere soddisfatti solo mediante stretta collaborazione tra i professionisti di medicina di laboratorio ed i medici d'urgenza, in un'ideale *governance* che dovrebbe consentire di collaborare attivamente nel progettare i pannelli di esami urgenti, sulla base di considerazioni di natura clinica, epidemiologica, analitica, logistica ed organizzativa.

### La governance degli esami urgenti

Gli elementi fondamentali che la medicina di laboratorio dovrebbe perseguire per rispondere adeguatamente al quesito clinico sono riassumibili in tre aspetti, e cioè (a) la qualità del dato generato, che corrisponde alla completezza ed esaustività dell'informazione veicolata dai risultati degli esami, (b) la disponibilità di esami clinicamente utili e (c) il tempo di risposta (TAT) (3). Nella medicina d'urgenza questi tre temi sono maggiormente enfatizzati. La *governance* delle urgenze ha la conseguente necessità d'integrare i bisogni della clinica d'urgenza e l'organizzazione dei laboratori. L'organizzazione dei laboratori deve quindi focalizzarsi maggiormente verso la fase pre-preanalitica che si svolge all'esterno del laboratorio, standardizzare le fasi pre-analitica e analitica per garantire flussi continui e stabili di esami ed informazioni, ottimizzare la fase post-analitica per la rapida comunicazione dell'informazione ed, infine, non esimersi dall'intervenire anche nella fase post-post-analitica per il completamento dell'informazione e consentire il raggiungimento degli esiti attesi (4).

Un'informazione clinicamente utile dipende in larga misura da una richiesta appropriata e da una corretta scelta degli esami atti a soddisfare la richiesta. La definizione di profili chiari e standardizzati per patologia consente allo stesso tempo di non tralasciare esami fondamentali e di non essere devianti da risultati "collaterali", privi di stretta correlazione con segni e sintomi del paziente (5). Le attuali procedure di *triage*, comuni in Pronto Soccorso (PS) per fronteggiare l'elevato numero di richieste, spostano spesso la valutazione medica ad un tempo successivo al prelievo dei campioni, generando talora richieste più ampie del necessario, successive domande di integrazione o ritardi nell'invio dei campioni per completare la richiesta (6). Le politiche di aggiunta di esami (*add-on*) a campioni già ricevuti dovrebbero essere riconsiderate alla luce del percorso del paziente in PS (7).

Malgrado l'aggiunta di esami si collochi nell'ambito

della disponibilità a richiedere, è proprio la disponibilità di esami specialistici d'urgenza a creare oggi maggiori criticità in conseguenza del continuo processo di riorganizzazione e consolidamento dei servizi di medicina di laboratorio (8). Il mantenimento di una rete diffusa di presidi d'urgenza sul territorio ed il contemporaneo consolidamento dei laboratori in pochi centri, rendono più difficile offrire un largo volume di esami corredati da un contenuto informativo specifico. L'idea che soluzioni di diagnostica decentrata (*point-of-care testing*; POCT) o laboratori a risposta rapida possano rispondere ad ogni esigenza della medicina d'urgenza si scontra con le molteplici complessità che si possono incontrare (9). Ne sono validi esempi la determinazione dei farmaci anticoagulanti orali diretti (10), la diagnostica batteriologia o virologica biomolecolare e colturale (11), la diagnostica tossicologica (12), le troponine ad alta sensibilità (13) ed i marcatori di danno renale acuto (14).

Un ultimo elemento, forse più enfatizzato, è il TAT, il quale deve essere affrontato come TAT terapeutico e non di solo laboratorio. Adozione di profili definiti e *order entry* informatici, eliminazione di documenti cartacei e trascrizioni, trasporto rapido dei campioni, così come refertazione telematica in continuo consentono di ottimizzare le fasi extra-laboratorio del TAT, mentre è l'evoluzione dei cosiddetti "corelab" verso il "tutto sempre urgente" a rispondere più idoneamente alla necessità del TAT di laboratorio (15). Si può in sintesi riprendere il famoso concetto del "brain-to-brain loop" di George D. Lundberg, adattarlo alla medicina d'urgenza, semplificando alcuni passaggi e focalizzando su altri, per completare l'intero circolo più rapidamente e ottenendo comunque il medesimo risultato, cioè un esito favorevole per il paziente (16).

Facendo seguito all'articolo collettivo pubblicato in concomitanza del primo incontro congiunto Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC)-SIBioC "Medicina di laboratorio e Medicina d'urgenza: un connubio indissolubile" (17), questo documento collettivo rappresenta una sintesi dei temi affrontati nel secondo evento congiunto "Medicina di Laboratorio e Medicina d'Urgenza: il connubio continua", e comprendente specificatamente la *governance* degli esami urgenti, i disturbi dell'equilibrio acido-base, il tromboembolismo venoso, lo scompenso cardiaco acuto, i traumi, le intossicazioni acute, le virosi ed altre infezioni emergenti (Tabella 1).

### DISTURBI DELL'EQUILIBRIO ACIDO-BASE

I disturbi dell'equilibrio acido-base si distinguono classicamente in disturbi semplici (acidosi metabolica e respiratoria acuta/cronica; alcalosi metabolica e respiratoria acuta/cronica) e in disturbi misti, doppi, tripli e quadrupli (18-20). Mentre l'eziologia è inquadrabile partendo dalle alterazioni fisiopatologiche, l'inquadramento clinico va considerato soprattutto in rapporto alle condizioni cliniche alla base delle alterazioni acido-base. Le acidosi metaboliche

**Tabella 1***Esami diagnostici per alcune patologie di frequente riscontro in Medicina d'Urgenza*

Patologia	Test di laboratorio
Alterazioni dell'equilibrio acido-base	Emogasanalisi, emoglobina, acido lattico, ionemia
Tromboembolismo venoso	D-dimero
Trauma in generale	Aminotransferasi, bilirubina, creatinina, lipasi, emoglobina, equilibrio acido-base
- Cranico	- Proteina S100B
- Toracico	- Troponine cardiache e peptidi natriuretici
- Addominale	- Proteine leganti gli acidi grassi (FABP)
- Politrauma	- Creatina kinasi (CK) e mioglobina
- Coagulopatia da trauma	- Tromboelastogramma (TEG) o tromboelastometria rotazionale (ROTEM)
Scompenso cardiaco	Troponine cardiache e peptidi natriuretici, soprattutto peptide natriuretico di tipo B (BNP) e frammento N-terminale del proBNP (NT-proBNP)
Malattie infettive	Test molecolari rapidi; procalcitonina e/o presepsina; esami sierologici e colturali
Intossicazioni	Screening tossicologico (metodiche immunoenzimatiche); esami di approfondimento

comprendono quelle ad elevato gap anionico e quelle ipercloremiche. Quelle a elevato gap anionico sono facilmente inquadrabili perché dovute generalmente alla produzione endogena di acidi (acido lattico e chetoacidi) o alla loro mancata eliminazione per via renale. Se nessuna di queste condizioni è presente, la causa dovrebbe essere di natura tossicologica, eventualità da considerare quando l'aumento del lattato non è giustificabile da ridotta perfusione tissutale o iperattivazione del sistema adrenergico. L'acidosi ipercloremica è determinata essenzialmente da perdita di bicarbonato per via intestinale o renale, o da mancato riassorbimento/generazione dello stesso per danno del tubulo renale. Nel caso dell'acidosi respiratoria (acuta e cronica) la causa è imputabile all'aumento di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) conseguente ad alterazioni della ventilazione alveolare (*pump failure*), come espresso dall'equazione della  $[pCO_2] = [VCO_2]/[VA]$ , laddove per VCO<sub>2</sub> e VA si intendono produzione CO<sub>2</sub> e ventilazione alveolare. L'alcalosi metabolica è causata in prevalenza dalla perdita di ione cloro dal tubo digerente o dal rene (da esempio a seguito di vomito o utilizzo di diuretici), da perdita di potassio o da una contrazione del volume, cui segue un aumento del bicarbonato plasmatico (18-20). La fase di mantenimento è legata all'incapacità del rene di eliminare il bicarbonato in eccesso. L'alcalosi respiratoria acuta o cronica è determinata da un'iperventilazione conseguente a ipossiemia dovuta a riduzione dell'ossigeno ambientale, da shunt polmonare o da cause che determinano uno stimolo alla ventilazione in assenza di ipossiemia (ansia, ipertiroidismo, eccetera). La forma cronica presenta tipicamente una normalizzazione del pH, cosa che non succede negli altri disordini semplici. Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche, come detto sopra, queste sono in parte ascrivibili al disordine acido-base in sé (molto spesso alterazioni cardio-vascolari) e in parte alla condizione patologica che ha determinato l'alterazione. Nei disordini misti bilanciati (acidosi + alcalosi) mancano tipicamente le manifestazioni cliniche legate alle variazioni di pH (18-20).

L'emogasanalizzatore, ideato originalmente per la valutazione di pH, ossigeno e CO<sub>2</sub>, offre oggi un ampio pannello di analiti in aggiunta alla determinazione dei gas. I migliori strumenti in commercio consentono determinazioni di elevata qualità analitica, le quali sono oggetto di linee-guida internazionali (21). Tra i parametri indispensabili si annovera la determinazione dell'emoglobina (e delle sue frazioni), che deve essere necessariamente quantificata e non calcolata. Grazie all'integrazione di vari sistemi di misura, è oggi possibile analizzare contestualmente disordini elettrolitici, acido-base e dismetabolici, avvalendosi anche di equazioni essenziali per la valutazione quantitativa e diagnosi differenziale, purché si consideri sempre il contesto clinico e gli eventuali trattamenti cui sono sottoposti i pazienti. Tra i vari parametri ha una rilevanza sostanziale l'acido lattico, determinato negli emogasanalizzatori come acido L-lattico. L'acidosi lattica è l'acidosi metabolica più frequente nei pazienti ospedalizzati e in emergenza-urgenza, dato l'elevato numero di cause che la possono determinare (22). Anche la "curva di clearance" del lattato ha significato prognostico per morbilità e mortalità. In ambito neonatologico, l'acido lattico appare importante per la valutazione del neonato asfittico e/o per la sepsi, e potrebbe essere anche considerato indicatore prognostico di danni peri-partum (23). Sostanziali evidenze disponibili in letteratura rilevano la necessità di implementare gli emogasanalizzatori in PS e nei reparti di terapia intensiva. Si ravvisa inoltre l'opportunità di dotare gli strumenti di un pannello di analiti comprendenti almeno sodio, potassio, cloro e lattato, al fine di soddisfare maggiormente le esigenze cliniche per diagnosi e monitoraggio.

## TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Secondo le più recenti statistiche pubblicate dall'American Heart Association (AHA) (24), il rischio di sviluppare uno o più eventi di tromboembolismo venoso (TEV; comprensivo di trombosi venosa profonda e

embolia polmonare) nel corso della vita è prossimo all'8%. Le conseguenze a breve e medio termine di questa patologia sono gravi. La mortalità a 30 giorni ed un anno raggiunge l'11% e il 23% rispettivamente, essendo anche sostanzialmente più elevata (fino al 53%) in pazienti neoplastici, mentre eventi recidivanti possono coinvolgere fino al 30% dei pazienti. In circa il 50% degli eventi è possibile riconoscere una causa scatenante (principalmente immobilizzazione, traumi, chirurgie o presenza di neoplasie). I principali fattori di rischio per TEV sono età avanzata, storia familiare o personale positiva per pregressi eventi tromboembolici, obesità, trauma o fratture, ospedalizzazione, immobilità prolungata (compresi viaggi e lunga persistenza in posizione seduta), neoplasie, infezioni, patologie renali o neurologiche, utilizzo di pillola anticoncezionale o terapia ormonale sostitutiva, gravidanza e puerperio, congiuntamente a varie condizioni trombofiliche ereditarie (deficit di antitrombina, proteine C ed S della coagulazione, mutazione del fattore V di Leiden, polimorfismo 20210A del gene della protrombina) o acquisite (sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi, anticorpi anti-cardiolipina, iperomocisteinemia) (25,26).

Il TEV è una malattia sostanzialmente multifattoriale, causata da uno sbilanciamento tra produzione e rimozione di materiale emocoagulativo all'interno dei vasi venosi, e secondaria a uno o più fattori della "triade di Virchow" (ipercoagulabilità, stasi venosa, danno endoteliale) (25,26). In prospettiva clinica, la diagnosi di TEV non è semplice, poiché sovente la trombosi può rimanere silente. Se può apparire complessa la diagnosi di trombosi venosa profonda, sicuramente la presentazione clinica dell'embolia polmonare è spesso ancora più insidiosa. Nel 90% dei casi il sospetto è evocato dalla presenza di sintomi aspecifici, comunemente presenti anche in numerose patologie cardiache e polmonari, mentre nei casi più gravi la presentazione può essere drammatica, con sincope, shock e morte improvvisa (27). Poiché i segni e i sintomi hanno una bassa sensibilità e specificità, l'iter diagnostico deve includere la valutazione della probabilità a priori di TEV, utilizzando alcuni score validati [ad esempio Wells e Geneva score (27,28)]. La stima della probabilità clinica può quindi essere supportata dalla determinazione del D-dimero, come descritto in seguito. La conferma diagnostica, in caso di sospetta embolia polmonare, è però possibile solamente utilizzando tecniche di imaging, in particolare scintigrafia polmonare e tomografia assiale computerizzata (27). Le linee guida della Società Europea di Cardiologia (ESC), pubblicate nel 2014 (28), pongono particolare enfasi sulla necessità di definire la gravità dell'embolia polmonare, non tanto sulla base del coinvolgimento anatomico, dell'estensione e distribuzione degli emboli polmonari, quanto piuttosto sulla base del rischio individuale di mortalità precoce. È quindi opportuno attenersi a una stratificazione prognostica, al fine di meglio indirizzare le scelte terapeutiche e definire la destinazione ottimale del paziente (28).

La diagnostica del tromboembolismo venoso ha

subito una considerevole evoluzione nel corso degli ultimi decenni (29). Le tecniche diagnostiche che hanno consentito i maggiori progressi in quest'ambito sono state indubbiamente l'ecodoppler venoso per la diagnostica della trombosi venosa profonda e le tecniche di imaging (tomografia assiale computerizzata, scintigrafia, risonanza magnetica nucleare) per quella dell'embolia polmonare. Anche in ambito di medicina di laboratorio gli esami diagnostici che si sono resi disponibili nel corso degli anni hanno subito un costante aggiornamento. In sintesi, gli analiti maggiormente studiati sono stati i frammenti di degradazione della fibrina (FDP), i monomeri solubili della fibrina, i fibrinopeptidi, il complesso trombina-antitrombina (TAT), il complesso plasmina-antiplasmina (PAP), il frammento 1+2 della protrombina (FP1+2), la proteina precorritrice del trombo (TPP), il complesso proteina C attivata-inibitore della proteina C (APC-CPI), la mieloperossidasi e il D-dimero (30). In conseguenza dell'ampia mole di evidenze scientifiche accumulate nel corso degli anni, quest'ultimo biomarcatore è andato progressivamente affermandosi come esclusivo riferimento per la diagnostica del tromboembolismo venoso, seppur con alcuni limiti che saranno brevemente descritti in seguito. Indipendentemente dalla tecnica analitica utilizzata per la sua determinazione, l'efficienza diagnostica del D-dimero appare oggi sufficiente per consentirne l'impiego come test di screening, sia per la diagnostica della trombosi venosa profonda e sia per quella dell'embolia polmonare. Come tutti i test di screening, infatti, il D-dimero ha un elevato valore predittivo negativo per queste patologie (molto prossimo al 99%), pur essendo caratterizzato da un valore predittivo positivo limitato (anche inferiore al 50%) e largamente dipendente dalla probabilità pre-test. Le maggiori criticità ancora esistenti in merito all'interpretazione dei risultati del D-dimero sono quindi legate alla scarsa specificità diagnostica (il valore del D-dimero è sovente aumentato in corso di patologie non essenzialmente trombotiche, come infezioni, cancro, scompenso cardiaco, traumi, insufficienza epatica e renale, eccetera), alla cinetica e relativa finestra diagnostica, alla sede ed estensione del processo trombotico, al grado di fibrinolisi ed all'utilizzo concomitante di anticoagulanti.

Un recente documento congiunto AcEMC-SIBioC ha cercato di puntualizzare alcuni aspetti essenziali nella determinazione del D-dimero in urgenza/emergenza (31). In sintesi, si consiglia di utilizzare il risultato del D-dimero nell'ambito di un algoritmo diagnostico validato (che ne prediliga il valore predittivo negativo), di utilizzare una soglia diagnostica validata e possibilmente corretta per l'età del paziente sopra i 50 anni, di analizzare il risultato alla luce della presenza di altre patologie non-trombotiche che ne possano aumentare la concentrazione in circolo, così come di riflettere sul fatto che la prestazione analitica può essere inferiore in pazienti che si presentino precocemente (prima di 3 ore dall'evento), tardiva (dopo 15 giorni dall'evento), o in pazienti sottoposti a terapia anticoagulante o fibrinolitica. Altri aspetti importanti, specificatamente relativi

all'analisi del D-dimero, concernono la necessità di utilizzare campioni di sangue raccolti in 3,2% (105-109 mM) sodio citrato, di evitare (per quanto possibile) la raccolta del campione di sangue da ago cannula o mediante aghi dal calibro troppo ridotto, così come di utilizzare metodi quantitativi opportunamente validati, con intervallo di misura compreso almeno tra 50-5000 µg/L, con imprecisione alla soglia diagnostica <10% e tempo di risposta inferiore ad 1 ora (31). Per quanto concerne l'armonizzazione dell'unità di misura, si consiglia di riportare i risultati in µg/L di fibrinogeno equivalenti (FEU), evitando di utilizzare metodi diversi per monitorare nel tempo i pazienti (31).

### SCOMPENSO CARDIACO ACUTO

Lo scompenso cardiaco acuto è una condizione clinica frequentemente causa di accesso al PS e rappresenta una sfida per il medico d'urgenza, sia per l'importanza del corretto e rapido inquadramento clinico, sia per la necessità di un efficace e tempestivo approccio terapeutico. Le due tipologie di scompenso cardiaco acuto sono costituite sostanzialmente dalla forma *de novo*, che insorge acutamente e inaspettatamente, con andamento rapidamente evolutivo, e le assai più frequenti riacutizzazioni di uno scompenso cardiaco cronico associato a malattie preesistenti, quali la malattia coronarica, valvolare o dilatativa che, in condizioni particolari e spesso in seguito a fattori scatenanti, si possono riesacerbare (32). In quest'ultimo caso si può manifestare con sintomi lievi prevalentemente correlati alla ritenzione (27,28) di liquidi (edemi declivi, turgore giugolare, ortopnea) o, più raramente, con un quadro di edema polmonare acuto, fino allo shock cardiogeno. In questa prospettiva va considerato che il medico d'urgenza deve essere in grado di effettuare una attenta valutazione del contesto, tenendo conto che lo scompenso cardiaco acuto si presenta più frequentemente con sintomi multiformi e solo raramente con il quadro tipico e inequivocabile, ancor più nella fascia di popolazione anziana che ormai rappresenta l'utenza prevalente dei dipartimenti d'emergenza (33).

Deve essere quindi posta molta attenzione alla valutazione delle problematiche cliniche associate che rappresentano una frequente causa scatenante, oltre che alla diagnosi finale di scompenso cardiaco acuto. Tra di esse, le aritmie meritano particolare attenzione, così come le problematiche respiratorie croniche, il diabete e le infezioni gravi sistemiche. Le armi a disposizione per una corretta diagnosi sono consuete, iniziando da una corretta (seppur veloce) contestualizzazione anamnestica, per passare poi alla ricerca di segni clinici più evidenti, e suffragando il tutto con l'uso di elettrocardiogramma e tecniche di imaging, sempre più frequentemente corredate dall'ecografia al letto del paziente, la quale rappresenta una metodica rapida, ripetibile e caratterizzata da elevata efficienza diagnostica in mani esperte (34). La diagnostica di laboratorio e la ricerca di eventuali indicatori specifici

saranno quindi d'aiuto al medico d'urgenza per diagnosticare correttamente ed iniziare rapidamente il trattamento di un quadro clinico potenzialmente ad alta mortalità in fase acuta.

Tutte le più recenti linee guida nazionali e internazionali raccomandano l'utilizzo della misura dei peptidi natriuretici (PN) come biomarcatori di scelta per la diagnosi, la prognosi e il monitoraggio dei pazienti con scompenso cardiaco, sia acuto e sia cronico (33). Anche i risultati degli studi clinici sull'utilizzo dei nuovi farmaci, denominati *Angiotensin Receptor-Nephrilysin Inhibitors* (ARNI), ha sostanzialmente confermato l'utilità clinica della misura dei PN nei pazienti con scompenso cardiaco (35). Nondimeno, nei pazienti sottoposti a terapia con questi farmaci è raccomandata una particolare attenzione riguardo all'interpretazione dei risultati della misura dei PN. È noto, infatti, come questi farmaci possano interferire nella produzione e metabolismo periferico, così alterando il rapporto fra i livelli circolanti di ormoni biologicamente attivi quali peptide natriuretico atriale (ANP), peptide natriuretico di tipo B (BNP) e peptide natriuretico di tipo C (CNP), così come dei peptidi ad essi correlati con attività biologica ridotta come i precursori proANP, proBNP e proCNP, o del tutto assente come frammento intermedio del proANP (MR-proANP), frammento N-terminale del proBNP (NT-proBNP) e frammento N-terminale del proCNP (NT-proCNP) (36).

Molti studi recenti riportano come la determinazione delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) sia utile sia nella diagnosi differenziale, sia nella stratificazione del rischio dei pazienti con scompenso cardiaco. Dal punto di vista fisiopatologico, la determinazione delle cTn, soprattutto mediante metodi ad alta sensibilità (*high-sensitivity*, hs), appare molto utile. Nello scompenso cardiaco, sia acuto sia cronico, i valori delle hs-cTn appaiono spesso aumentati rispetto al valore decisionale (cioè il 99° percentile della popolazione di riferimento). Il riscontro di elevati livelli circolanti di PN e hs-cTn indica che co-esistono nel paziente una disfunzione funzionale cardiaca (aumento dei PN) ed una sofferenza tissutale del miocardio (aumento delle hs-cTn) (37). Valori aumentati di hs-cTn con cinetica tipica (aumento-diminuzione) all'ingresso in PS supportano la presenza di un danno cardiaco acuto e sono quindi suggestivi, in presenza di quadro clinico ed elettrocardiografico compatibile con ischemia cardiaca, per diagnosi di infarto acuto del miocardio. È altresì importante rilevare che i PN e le hs-cTn tendono a diminuire, anche se con cinetica differente, nei pazienti con scompenso cardiaco che rispondono favorevolmente alla terapia, riflettendo pertanto una prognosi più favorevole (37).

Studi più recenti confermano le raccomandazioni delle linee guida che sconsigliano l'utilizzo nella routine clinica di altri biomarcatori di scompenso cardiaco acuto quali microRNA, osteopontina, *insulin-like growth factors* (ILGFs), *soluble suppression of tumorigenicity 2* (sST2), *galectina-3* e *growth differentiation factor-15* (GDF-15) (33). Nondimeno, altri studi hanno però evidenziato come alcuni di questi marcatori possano essere utili

nella valutazione del rischio a breve (<30-60 giorni) e/o medio-termine (6 mesi) in alcune tipologie di pazienti che si presentano al PS con scompenso cardiaco acuto (37).

## TRAUMI

Il trauma non può essere considerato una singola patologia, vista l'estrema eterogeneità dei sistemi organici coinvolti. Tuttavia, ogni trauma grave tende a complicarsi con un quadro di shock emorragico ipovolemico e, spesso, con un'evoluzione settica. Negli ultimi decenni si sono accumulate molte conoscenze sulla complessità dei meccanismi dello shock emorragico a livello cellulare, tessutale e dell'intero organismo. A livello cellulare lo shock si manifesta quando l'apporto di ossigeno è insufficiente per le richieste aerobiche; iniziano pertanto ad accumularsi lattati, fosfati inorganici e radicali liberi. A livello tissutale l'ipovolemia e la vasocostrizione causano ipoperfusione e danno d'organo a reni, fegato, intestino, muscolo striato, con conseguente innesco d'insufficienza multiorgano. Il livello successivo, nelle emorragie più gravi, è il danno da ipoperfusione di encefalo e miocardio, con conseguenze spesso fatali (38). I traumi di qualsiasi entità o natura possono interessare persone altrimenti sane, oppure pazienti già affetti da patologie (cardiopatie, pneumopatie, diabete mellito) che tendono inevitabilmente ad aggravarne il decorso. Tra queste, le più indicative in termini d'implicazioni operative e/o prognostiche sono le patologie cardiovascolari che richiedono trattamenti anticoagulanti e/o antiaggreganti piastrinici, con ovvie ripercussioni sulla gestione delle eventuali emorragie. Il trauma è in sé in grado di provocare una coagulopatia di eziopatogenesi multifattoriale (perdita e/o diluizione dei fattori della coagulazione, ipotermia, acidosi, coagulazione intravascolare disseminata) (38). Appare quindi evidente che nella valutazione del paziente traumatizzato debbano essere innanzitutto considerati i parametri emocitometrici e coagulativi, corredati dagli indici di funzionalità renale e dalla valutazione dell'equilibrio acido-base. Per la valutazione della coagulopatia da trauma si sono dimostrati di particolare rilevanza i test viscoelastici eseguibili al letto del paziente [tromboelastogramma (TEG) o tromboelastometria rotazionale (ROTEM)], in grado di valutare in tempo reale l'evoluzione dell'alterazione fisiopatologica, e di guidarne pertanto il trattamento (39). Contestualmente, per ogni trauma maggiore dovranno essere raccolte le prove di compatibilità trasfusionale, in previsione di eventuali trattamenti sostitutivi.

Nella valutazione di un paziente con trauma, sia esso cranico, toracico o addominale, la determinazione di un biomarcatore circolante può fornire informazioni aggiuntive rispetto all'esame clinico e all'imaging. In primo luogo, può essere ottenuto utilizzando tecniche minimamente invasive e con costi inferiori. In secondo luogo, un biomarcatore ha il potenziale di indicare la gravità e la progressione del danno e, in alcuni casi, di predire gli esiti. Infine, le variazioni nella concentrazione

di un biomarcatore possono essere interpretate per valutare l'efficacia del trattamento. Dall'analisi della letteratura più recente, si evince come i biomarcatori di trauma cranico più promettenti siano la proteina S100B e la proteina fibrillare acida della glia (GFAP), entrambe espresse nelle cellule astrogliali (40). La cinetica ed il profilo temporale di questi biomarcatori di danno neuronale acuto e di alterazione della barriera ematoencefalica sono importanti. È stato infatti osservato come i valori di S100B si modifichino rapidamente nelle ore successive all'evento traumatico, cosicché la concentrazione misurata dipende dalla tempistica di prelievo. È stato inoltre dimostrato che la proteina S100B, utilizzata scegliendo un valore soglia con elevato valore predittivo negativo, potrebbe essere molto utile in pazienti con lesioni craniche lievi/moderate per ridurre il numero di soggetti da sottoporre a tomografia assiale computerizzata (41).

Tra i marcatori biochimici diagnostici e prognostici di trauma cardiaco, conseguenza di contusione miocardica o di danno penetrante, i più utilizzati sono l'isoenzima MB della creatina chinasi (CK-MB) e le troponine cardiache. Poiché è stato dimostrato che la concentrazione di troponina è aumentata sia nei pazienti con politrauma, sia nei pazienti con traumi cranici, è stato suggerito di utilizzare la misurazione di questo biomarcatore per identificare il potenziale coinvolgimento cardiaco nei pazienti traumatizzati (42). Altri biomarcatori che potrebbero essere utili nella valutazione della gravità del danno traumatico cardiaco sono il peptide natriuretico cerebrale (BNP) ed il frammento N-terminale del peptide natriuretico (NT-proBNP), secreti dal ventricolo cardiaco in risposta all'eccessivo stiramento delle cellule muscolari. Per i traumi massivi, sovente accompagnati da raddomiolisi, la determinazione della creatinina totale e della mioglobina rimangono ad oggi gli esami clinicamente più utili, soprattutto per la gestione clinica del paziente e la valutazione prognostica (43).

Nonostante il gold standard per la valutazione di emorragie e lesioni degli organi parenchimali conseguenza di trauma addominale sia rappresentato da esami di imaging, quali l'esame ecografico e la tomografia assiale computerizzata, alcuni biomarcatori circolanti rilasciati precocemente, quali gli isoenzimi intestinale (I) ed epatico (L) delle proteine leganti gli acidi grassi (FABP), possono essere utilizzati nella valutazione del trauma addominale (44).

## VIROSI ED ALTRE INFEZIONI EMERGENTI

I pazienti ricoverati in urgenza con sospetta patologia infettiva rappresentano spesso una formidabile sfida sia per la medicina clinica, sia per quella di laboratorio, le quali dovrebbero raccordarsi e predisporre un approccio diagnostico efficace, efficiente, ragionevole e tempestivo. Accanto a questi fondamentali attributi, apparirebbe altresì vantaggioso poter garantire un'efficace *stewardship* diagnostica (esami appropriati per il singolo paziente, risultati accurati e clinicamente

rilevanti) ed antimicrobica (raggiungimento del miglior esito per il paziente, evitando terapie non necessarie) (45). Per il medico d'urgenza, la sfida consiste soprattutto nell'agire con rapidità e sicurezza nell'ambito di un processo decisionale che include potenzialmente un grande numero di variabili, come ad esempio il fatto che alcune virosi tendono a manifestarsi con sindromi cliniche sovrapponibili. Nel caso in cui non sia stata predisposta un'accurata gerarchizzazione dei dati e delle possibili diagnosi differenziali, il medico d'urgenza corre il rischio di richiedere al laboratorio analisi ridondanti o inappropriate, onerose e talvolta anche inutili (soprattutto se prive di un elevato valore predittivo negativo). Il paziente che si presenta al PS rappresenta anche per lo specialista infettivologo una sfida particolarmente difficile, sia per la ristrettezza dei tempi d'azione (cui non è abituato), sia per la possibile lacunosità dei dati clinico-anamnestici di cui può disporre.

In medicina di laboratorio le nuove tecnologie molecolari rapide, associate al corretto utilizzo di alcuni biomarcatori come la procalcitonina e la presepsina, stanno modificando radicalmente le strategie per la diagnosi precoce e il trattamento del paziente, soprattutto quelli con sepsi (46). La valutazione infettivologica del paziente che si presenta in PS presuppone un classico approccio *patient-oriented* (a partire dalla sindrome clinica di presentazione, quale patologia di pertinenza infettivologica) oppure *pathogen-oriented* (cosa ricercare in termini di sintomi e segni clinici e cosa richiedere in termini di indagini microbiologiche, nel sospetto di un determinato agente eziologico, tenendo conto della epidemiologia locale e del rischio del paziente). Le principali tecniche molecolari rapide di recente introduzione sono in grado di rilevare in tempi brevi (1-8 ore, rispetto a 72 ore circa delle tecniche colturali classiche) patogeni singoli o multipli nella stessa seduta analitica, utilizzando un approccio sindromico (meningiti, polmoniti, sepsi, e così via), direttamente da campione clinico per virus e batteri (sangue, liquido cefalorachidiano, materiale respiratorio, e altri). I principali metodi di rilevazione sono costituiti da amplificazione genica tradizionale e real-time (patogeno specifica, ampio range, multiplex), *microarray probes* dopo *polymerase chain reaction* (PCR), *filmarray*, *peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization*, *loop-mediated isothermal amplification*, tra le altre (46).

Per quanto concerne l'isolamento e l'identificazione dei batteri responsabili di sepsi, l'emocoltura rimane tuttavia la tecnica di riferimento, in quanto prodromica all'esecuzione di test di sensibilità antimicrobica e per scopi epidemiologici, malgrado sovente il suo TAT ecceda la rapidità di evoluzione clinica (anche una sola ora di ritardo nella somministrazione di antibiotici comporta, per alcune patologie, un incremento di mortalità prossimo all'8%) (47). Le nuove tecniche eziologiche rapide potrebbero consentire un impiego più ristretto dello spettro di antibiotici in terapia empirica, congiuntamente ad un uso più appropriato di farmaci antivirali. Queste tecniche non sono influenzate

dall'eventuale terapia antimicrobica in corso e dal fatto che alcuni microrganismi non sono facilmente coltivabili. Esse rappresentano comunque un considerevole avanzamento nell'efficienza ed efficacia diagnostica, soprattutto al confronto con i metodi convenzionali.

Esistono peraltro varie problematiche legate all'implementazione di questi test, principalmente rappresentate dalla necessaria analisi di costo-efficacia, dall'equilibrio fra centralizzazione degli esami e tempi di trasporto dai laboratori periferici, dalla revisione dei flussi di lavoro e degli algoritmi diagnostici, dall'addestramento del personale all'esecuzione 24 ore al giorno (7 giorni su 7) degli esami, e dalla corretta ed immediata interpretazione/comunicazione dei risultati. Le principali difficoltà sono imputabili all'assenza di studi d'impatto clinico ed ai costi elevati. Esistono in commercio molte piattaforme tecnologiche e molti pannelli disponibili, particolarmente utili in alcune sindromi di particolare gravità e/o rischio di diffusione nella comunità e/o che necessitino d'interventi di sanità pubblica. Tra queste, giova ricordare in particolare le meningiti, le polmoniti e le sepsi. I relativi pannelli sono sostanzialmente costituiti da *Meningococco*, *S. pneumoniae*, *Listeria*, *Leptospira* (da liquido cefalorachidiano, pannello batterico), *Herpes Simplex Virus (HSV)*, *Varicella-Zoster (VZ)*, *Enterovirus*, *Parotite*, *Virus Toscana*, *West Nile Virus*, *Chikungunja* (da liquido cefalorachidiano, pannello virologico) per le meningiti; virus influenzali (da tampone faringeo) per infezioni delle basse vie aeree o pannello allargato virologico comprendente *Virus Respiratorio Sinciziale*, *Metapneumovirus*, *Parainfluenza*, *Adenovirus* sempre per infezioni delle basse vie aeree; così come pannelli rivolti ad identificare i più frequenti (e più complessi da trattare) patogeni di sepsi quali *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi-produttrice, *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina, *Acinetobacter* resistente ai fluorochinoloni (da flacone di emocoltura positivo). Indicazioni più esaustive sono riassunte nel recente documento dell'*Infectious Diseases Society of America* e dell'*American Society for Microbiology* (48).

A seguito dell'incremento di complessità della diagnostica molecolare per malattie infettive, la comunicazione di risultati clinicamente rilevanti diventa ancora più importante e necessaria per gestire il cambiamento. La positività per l'acido nucleico non equivale sempre alla rilevazione di un patogeno mediante tecniche colturali, criterio che consentirebbe invece di identificare con certezza l'agente eziologico responsabile della patologia. La positività con tecniche molecolari potrebbe essere invece imputabile a colonizzazione, infezione asintomatica, integrazione cromosomica, eliminazione protratta dopo un evento acuto ormai superato. Appare quindi essenziale realizzare una valida sinergia fra gli attori delle varie discipline coinvolte (medici d'urgenza, infettivologi, medici di laboratorio, direzione medica, farmacisti), utilizzando un approccio atto a sviluppare una conversazione bidirezionale (la cosiddetta *handshake stewardship*). Essa consente, infatti, audit prospettici e cicli di feedback, e rappresenta oggi la strategia

essenziale nell'ambito dei programmi di *stewardship* antimicrobica per ottimizzare l'uso degli antibiotici, la stesura di protocolli e algoritmi che comprendano le diverse prospettive di tutti gli attori del processo, la qualità della cura e la gestione del rischio clinico. Anche gli stakeholder dovrebbero essere coinvolti nel processo d'implementazione delle nuove tecnologie. Affinché questa nuova strategia possa concretizzarsi, è essenziale che il laboratorio di microbiologia/virologia sia attivo 24 ore al giorno, 7 giorni su 7. Accanto ai consueti esami microbiologici, è poi possibile (soprattutto per infezioni gravi e sistemiche) utilizzare alcuni biomarcatori quali procalcitonina e presepsina, le cui caratteristiche sono state recentemente oggetto di analisi approfondita da parte di un documento congiunto di AcEMC e SIBioC (49).

### INTOSSICAZIONI ACUTE

La diagnostica tossicologica è una sfida per il laboratorio. Almeno teoricamente, sarebbe necessario poter determinare un numero potenzialmente infinito di tossici o xenobiotici in tempi rapidi, al fine di garantire un impatto favorevole sulla gestione clinico-terapeutica del paziente in medicina d'urgenza. La finalità analitica è principalmente rivolta alla conferma anamnestica a supporto di dato clinico e diagnosi differenziale, alla valutazione della quantità del tossico assorbito, all'indicazione per il trattamento di maggiore efficacia e sicurezza, in particolare qualora esista un antidoto specifico da poter somministrare. Poiché è ragionevolmente impossibile poter disporre di tutti gli accertamenti richiedibili al laboratorio, è necessario scegliere gli esami da implementare basandosi su parametri quali l'impatto clinico del risultato prodotto, l'importanza e rilevanza dell'intossicazione, la complessità analitica, le tecnologie, le competenze e l'epidemiologia nella realtà socio-sanitaria di riferimento. Secondo indicazioni internazionali, ad esempio quelle anglosassoni (50), si suggerisce l'esecuzione entro 2 ore di digossina, paracetamolo, salicilati, acido valproico, paraquat, litio, teofillina, ferro, carbossi- e meta-emoglobina nei presidi in cui siano presi in carico pazienti intossicati. Sempre con tempi di risposta inferiori alle 2 ore si suggerisce invece l'esecuzione di fenobarbitale, fenitoina, carbamazepina, metotrexate, glicole etilico, metanolo, cianuro, colinesterasi, arsenico, tallio, mercurio, piombo, paraquat e screening tossicologico in centri regionali o sovra regionali di riferimento. Appaiono complessivamente più sobrie le raccomandazioni della *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB) (51), le quali suggeriscono di eseguire entro 1 ora dall'arrivo del paziente digossina, litio, etanolo, paracetamolo, salicilati, teofillina, acido valproico, fenobarbitale, metanolo, glicole etilico, screening tossicologico, carbossi- e meta-emoglobina. Le metodiche disponibili per la diagnostica tossicologica sono varie, sia per l'impiego routinario (mediante tecniche immunoenzimatiche o emogasanalisi), sia per i laboratori di secondo livello (mediante tecniche di

maggiore complessità, come la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa o alla spettrofotometria). Il ruolo del laboratorio avrebbe poi ancora più rilevanza quandanche fosse possibile eseguire uno screening approfondito, e in tempi rapidi, per le intossicazioni incognite. Purtroppo le tecnologie e modalità analitiche per questo ambito specifico della diagnostica tossicologica sono ancora in fase di studio, così come le valutazioni per la loro trasferibilità al laboratorio clinico. L'esame di laboratorio, come sempre, ha valore se l'informazione è correttamente compresa dal clinico, anche nei limiti intrinseci dell'esame, poiché un risultato positivo di un esame tossico non è sinonimo di intossicazione.

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Lippi G. The irreplaceable value of laboratory diagnostics: four recent tests that have revolutionized clinical practice. *eJIFCC*, 2019;30:7-13.
- American College of Emergency Physicians. Definition of Emergency Medicine. *Ann Emerg Med* 2016;68:142-3.
- Carraro P. Laboratorio nell'urgenza/emergenza. Esami di laboratorio raccomandati in alcune tipiche situazioni di Pronto Soccorso. *Biochim Clin* 2011;35:207-28.
- Dolci A, Giavarina D, Pasqualetti S, et al. Total laboratory automation: Do stat tests still matter? *Clin Biochem* 2017;50:605-11.
- Montagnana M, Lippi G. The risks of defensive (emergency) medicine. The laboratory perspective. *Emerg Care J* 2016;12:5581.
- Cervellin G, Cavazza M. Defensive medicine in the emergency department. The clinicians' perspective. *Emerg Care J* 2016;12:5615.
- Petrides AK, Bixho I, Goonan EM, et al. The benefits and challenges of an interfaced electronic health record and laboratory information system: effects on laboratory processes. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:410-7.
- Lippi G, Bassi A, Bovo C. The future of laboratory medicine in the era of precision medicine. *J Lab Precis Med* 2016;1:7.
- Lippi G, Mattiuzzi C, Plebani M. Stat testing utilization in clinical laboratories. National survey of Italian Society of Clinical Biochemistry and Molecular Biology (SIBioC). *Clin Chem Lab Med* 2014;52:e79-84.
- Tripodi A, Ageno W, Ciaccio M, et al. Position Paper on laboratory testing for patients on direct oral anticoagulants. A Consensus Document from the SISET, FCSA, SIBioC and SIPMeL. *Blood Transfus* 2018;16:462-70.
- Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2013;57 Suppl 3:S139-70.
- Boyle JS, Bechtel LK, Holstege CP. Management of the critically poisoned patient. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009;17:29.
- Lippi G, Cervellin G. Diagnosing myocardial injury in the high-sensitivity troponin era. *Emerg Care J* 2018;14:7834.
- Fan W, Ankawi G, Zhang J, et al. Current understanding and future directions in the application of TIMP-2 and IGFBP7 in AKI clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 2018

- doi: 10.1515/cclm-2018-0776.
15. Giavarina D. Reasons for integrating stat and routine laboratory testing. *Biochim Clin* 2014;38:404.
  16. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;245:1762-3.
  17. Lippi G, Balboni F, Bonfanti L, et al. Laboratory medicine and emergency medicine: an essential partnership. *Biochim Clin* 2018;42:335-42.
  18. Gennari FJ, Adrogue HI, Galla JH, et al. Acid-base disorders and their treatment. *Didcot UK: Taylor & Francis Group*, 2005.
  19. Casagrande I, Guariglia A, Sbrojavacca R, et al. *Acqua e sale-acidi e basi*. Totino, Italia: CGEMS Editore, 2004.
  20. Rose BD, Post TW. *Clinical Physiology of acid-base and electrolyte disorders*. 5th edition, New York USA: McGraw-Hill, 2001.
  21. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Blood gas and pH analysis and related measurements; Approved Guideline – Second Edition*. CLSI document C46-A2. CLSI: Wayne, PA, 2009.
  22. Kraut JA, Madias NE. Lactic acidosis. *N Engl J Med* 2014;371:2309-19.
  23. Shah S, Tracy M, Smyth J. Postnatal lactate as an early predictor of short-term outcome after intrapartum asphyxia. *J Perinatol* 2004;24:16-20.
  24. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. *Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation* 2018;137:e67-e492.
  25. Lippi G, Franchini M. Pathogenesis of venous thromboembolism: when the cup runneth over. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:747-61.
  26. Lippi G, Mattiuzzi C, Favalaro EJ. e-thrombosis: epidemiology, physiopathology and rationale for preventing computer-related thrombosis. *Ann Transl Med* 2018;6:344.
  27. Becattini C, Mattei C, Agnelli G. Dieci quesiti in tema di gestione del paziente con embolia polmonare. *G Ital Cardiol* 2018;19:13-23.
  28. Konstantinides SV, Torbi A, Agnelli G, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J* 2014; 35:3033-69.
  29. Lippi G, Danese E, Favalaro EJ, et al. Diagnostics in venous thromboembolism: from origin to future prospects. *Semin Thromb Hemost* 2015;41:374-81.
  30. Lippi G, Cervellin G, Franchini M, et al. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:459-71.
  31. Lippi G, Cervellin G, Casagrande I, et al. D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. Consensus document of AcEMC, CISMEL, SIBioC, and SIMeL. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:621-8.
  32. Hunter BR, Martindale J, Abdel-Hafez O, et al. Approach to acute heart failure in the emergency department. *Prog Cardiovasc Dis* 2017;60:178-86.
  33. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016;37:2129-200.
  34. Pang PS, Collins SP, Gheorghide M, et al. Acute Dyspnea and Decompensated Heart Failure. *Cardiol Clin* 2018;36:63-72.
  35. Lippi G, Sanchis-Gomar F. Monitoring B-type natriuretic peptide in patients undergoing therapy with neprilysin inhibitors. An emerging challenge? *Int J Cardiol* 2016;219:111-4.
  36. Pagel-Langenickel I. Evolving Role of Natriuretic Peptides from Diagnostic Tool to Therapeutic Modality. *Adv Exp Med Biol* 2018;1067:109-31.
  37. Lippi G, Cervellin G. Risk assessment of post-infarction heart failure. Systematic review on the role of emerging biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014;51:13-29.
  38. Cannon JW. Hemorrhagic Shock. *N Engl J Med* 2018;378:370-9.
  39. Pigna F, Lippi G, Saronni S, et al. Trauma-induced coagulopathy. A narrative review of goal-directed hemostatic resuscitation. *Emerg Care J* 2018;14:7569.
  40. Lippi G, Cervellin G. Protein S100B: from cancer diagnostics to the evaluation of mild traumatic brain injury. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:703-5.
  41. Cervellin G, Benatti M, Carbuicchio A, et al. Proteina S100B ed enolasi neurone-specifica nella valutazione iniziale del trauma cranico lieve nell'adulto: pronte per il debutto nel mondo reale? *Biochim Clin* 2014;38:227-33.
  42. Lippi G, Buonocore R, Mitarittono M, et al. Cardiac Troponin I is increased in patients with polytrauma and chest or head trauma. Results of a retrospective case-control study. *J Med Biochem* 2016;35:275-81.
  43. Lippi G, Schena F, Ceriotti F. Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. *Clin Chem Lab Med* 2018. doi: 10.1515/cclm-2018-0656.
  44. Voth M, Duchene M, Auner B, et al. I-FABP is a novel marker for the detection of intestinal injury in severely injured trauma patients. *World J Surg* 2017;41:3120-7.
  45. Powe J. Diagnosing infection. *J Family Community Med* 1997;4:17-9.
  46. Messacar K, Parker SK, Todd JK, et al. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *J Clin Microb* 2017;55:715-23.
  47. Lippi G. Sepsis biomarkers: past, present and future. *Clin Chem Lab Med* 2018. doi 10.1515/cclm-2018-1347
  48. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* 2018;67:e1-e94.
  49. Lippi G, Montagnana M, Balboni F, et al. Academy of Emergency Medicine and Care-Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology consensus recommendations for clinical use of sepsis biomarkers in the emergency department. *Emerg Care J* 2017;13:6877.
  50. Thompson JP, Watson ID, Thanacoody HKR, et al. Guidelines for laboratory analyses for poisoned patients in the United Kingdom *Ann Clin Biochem* 2014;51:312-25.
  51. Wu AH, McKay C, Broussard LA, et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: recommendations for the use of laboratory tests to support poisoned patients who present to the emergency department. *Clin Chem* 2003;49:357-79.

## Ridurre l'inappropriatezza in medicina di laboratorio: come, quando e perchè

Mario Plebani<sup>1</sup>, Giuseppe Lippi<sup>2</sup>, Martina Zaninotto<sup>1</sup>, Marcello Ciaccio<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università di Padova

<sup>2</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona

<sup>3</sup>Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata, Università degli Studi di Palermo - UOC e Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico, Palermo

### ABSTRACT

**Improving appropriateness in laboratory medicine: how, when and why.** The issue of the appropriateness in laboratory medicine has been discussed from several years in association to the parallel onset of two aspects: 1) the significant increase in tests demand and utilization, thanks to the development of laboratory automation and information laboratory systems (LIS), that allow to provide timely and reliable results to clinicians; 2) the opportunity, thanks to new pathophysiological knowledge and new technologies to introduce new and more sophisticated tests in clinical practice, providing a relevant support to the clinician in the management of patients, according to the improved vision of personalized medicine. As a consequence, the potential inappropriateness in test utilization and the need to manage demand and to reduce the redundant testing have received increasing concern. Several papers, in the recent literature, demonstrated that the inappropriateness in laboratory test utilization may represent a potential source of errors, and interesting strategies have been proposed and progressively adopted in order to limit this problematic outcome. An essential issue is to assure appropriateness not only in test request, but in all steps of the testing cycle. In particular, some of the more relevant issues has been linked to: rationalization of laboratory test ordering prescription, thanks to development of a computerized clinical decision support systems; implementation of the reflexing tests rule; definition of the minimum retesting interval according to the clinical and pathophysiological criteria; timely revision of the available panel tests in order to delete those considered obsolete from clinical and analytical point-of-view and, finally, improving the education in demand management. The "clinical laboratory stewardship" seems to be the new and shared strategy, that guarantees not only the appropriate utilization and interpretation of laboratory tests improving efficacy and providing efficiency but, more importantly, the future of the discipline and the role of laboratory professionals in the context of new and more complicated clinical and economical scenarios.

### APPROPRIATEZZA IN MEDICINA

Il concetto di appropriatezza in medicina è semplice e noto da molte decadi. Si definisce "necessaria" una procedura (diagnostica e/o terapeutica) se produce un beneficio sostanzialmente superiore al possibile danno e se è preferibile rispetto alle altre opzioni disponibili. Si definisce "appropriata" una procedura che produce maggiori benefici che danni con un margine sufficientemente ampio da giustificarne l'uso. Sono, invece, definite "equivocche" le procedure per le quali siano teoricamente equivalenti i potenziali benefici ed i rischi di danno per i pazienti, e "inappropriate" le

procedure per le quali i rischi di danno per il paziente siano chiaramente superiori ai potenziali benefici (1).

L'appropriatezza in medicina, quindi, si misura sul singolo paziente analizzando gli esiti clinici e, a livello di sistema sanitario, analizzandone gli effetti, anche in termini economici, sulla popolazione generale. Se il concetto appare semplice e chiaro, meno evidenti e condivisi sono i criteri che consentono di definire "appropriata" o "inappropriata" una procedura, poiché la misura degli esiti rappresenta tuttora un problema che richiede ulteriori approfondimenti e standardizzazione (2). Tuttavia, è importante sottolineare che per creare e documentare il valore dei servizi sanitari, le misure di

Corrispondenza a: Marcello Ciaccio, Università degli Studi di Palermo - UOC e Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico. Via del Vespro, 129 - 90127 Palermo. Tel 09123865701, E-mail marcello.ciaccio@unipa.it

Ricevuto: 15.02.2019

Accettato: 18.02.2019

Pubblicato on-line: 22.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.009

processo hanno un effetto limitato e non intercettano l'interesse dei pazienti (3). Pertanto, l'appropriatezza e l'eliminazione di servizi e procedure che non aggiungono valore per i pazienti deve essere misurata con indicatori di esito idonei a fotografare l'efficacia degli interventi nei percorsi diagnostico-terapeutici. La ricerca di appropriatezza ha il profondo significato di richiedere ai clinici di analizzare il modo convenzionale con il quale veniva praticata la medicina, di documentare le procedure ed i processi e di analizzarli per definirne il valore e migliorare la loro affidabilità sulla base delle prove (evidence-based medicine). In aggiunta, oltre ai criteri di efficienza ed efficacia, l'appropriatezza deve considerare il punto di vista dei pazienti ed il loro coinvolgimento nella scelta delle opzioni diagnostico-terapeutiche (4).

Nel capitolo generale dell'appropriatezza, l'appropriatezza prescrittiva assume un ruolo rilevante. L'appropriatezza prescrittiva è, infatti, necessaria al fine di rendere disponibile al paziente il migliore risultato rispetto ad un quesito clinico, affermando così la necessità di prescrivere l'indagine giusta, al paziente giusto e al tempo giusto, evitando gli sprechi potenziali legati ad un sovra- o sotto-utilizzo delle indagini, ma soprattutto sottolineando l'importanza che la richiesta di ogni esame diagnostico debba essere il risultato di un ragionamento clinico (5,6). I dati ad oggi disponibili in merito alla potenziale inappropriata sono molteplici, variegati e difficilmente confrontabili, in quanto elaborati in contesti clinici, geografici, organizzativi e normativi alquanto differenti.

## APPROPRIATEZZA IN MEDICINA DI LABORATORIO

Il tema dell'appropriatezza in medicina di laboratorio si è andato sviluppando a partire dagli anni '70 per due fenomeni convergenti:

- il continuo e significativo aumento delle richieste di esami di laboratorio associato all'introduzione dell'automazione e dell'informatica per supportare la risposta alla crescente domanda clinica;
- l'introduzione di esami complessi, sempre più rilevanti per il ragionamento ed il processo decisionale clinico, per la gestione delle condizioni cliniche del paziente, per l'identificazione di fattori di rischio in soggetti asintomatici, per la guida mirata ed il monitoraggio delle terapie e per una medicina sempre più personalizzata.

Il "combinato-disposto" di questi due fattori ha determinato una crescente attenzione al tema dell'appropriatezza nella richiesta di esami di laboratorio e l'eccesso di prescrizione di esami di laboratorio è divenuto ormai un luogo comune, anche se scarsamente supportato da dati obiettivi (7-9).

Gli studi pubblicati in letteratura si sono concentrati frequentemente sulle motivazioni dell'eccesso di prescrizione, identificando alcune problematiche quali la medicina difensiva, l'incertezza diagnostica, l'assenza di riscontri rispetto alla prescrizione e i deficit formativi dei medici, specialmente di quelli neolaureati e degli specializzandi, prima ancora di definire cosa significhi "appropriatezza" in medicina di laboratorio.

Il concetto di "appropriatezza in medicina di laboratorio", infatti, si è evoluto nel tempo a riflettere la progressiva crescita dell'importanza della disciplina e del

**Tabella 1**  
Definizioni di appropriatezza in medicina di laboratorio

Anno	Riferimento	Autore	Definizione
1975	12	Lundberg GD	Gli esami di laboratorio non dovrebbero essere mai richiesti senza avere prima formalizzato un piano su come utilizzare l'informazione che ne deriva
1996	13	College of American Pathologists	Il grado con il quale una particolare procedura, esame o servizio, è efficace, chiaramente indicato, non eccessivo, adeguato in quantità ed eseguito in regime ospedaliero, ambulatoriale, a domicilio o in altri ambiti indicati a rispondere ai bisogni dei pazienti
1998	14	Lundberg GD	Il reale motivo per richiedere un'analisi di laboratorio è migliorare gli esiti per il singolo paziente o per la salute pubblica
2003	15	Price CP	Un esame appropriato è quello per il quale il risultato fornisce una risposta ad un quesito, rendendo possibili una decisione e un'azione clinica conseguente
2013	16	Fryer AA	Una richiesta inappropriata è quella che non dovrebbe essere eseguita in quanto effettuata sul paziente sbagliato, al tempo sbagliato, con modalità sbagliata o per un esame sbagliato
2016	17	Plebani M	L'appropriatezza in medicina di laboratorio si fonda sul principio delle "5 cose giuste" da fare nelle diverse fasi dell'esame di laboratorio (dalla fase pre-pre-analitica e fino a quella post-post-analitica).

suo valore nei percorsi diagnostico-terapeutici. Se, infatti, è vero che i costi degli esami di laboratorio rappresentano meno del 2% della spesa sanitaria complessiva, il loro impatto complessivo è molto più elevato perché l'informazione di laboratorio influenza la maggior parte delle decisioni cliniche e determina, quindi, la richiesta di ulteriori esami e procedure diagnostiche-terapeutiche (10,11). La Tabella 1 illustra l'evoluzione del concetto di appropriatezza in medicina di laboratorio, a partire dagli anni '70 ad oggi.

Come si può chiaramente osservare dalla lettura delle definizioni, il concetto di appropriatezza in medicina di laboratorio si è andato evolvendo dall'iniziale ed essenziale necessità che la richiesta di esami sia motivata da un ragionamento e da uno specifico quesito clinico, alla valutazione degli esiti per il singolo e/o per la popolazione e, infine, si è basata sull'importanza della qualità in tutte le fasi del ciclo dell'esame di laboratorio. In accordo con il mantra iniziale "no harm, no waste", il concetto di appropriatezza abbraccia, oggi, la necessità che l'analisi di laboratorio influisca sul processo decisionale clinico e sia in grado di determinare esiti validi. Secondo questo punto di vista, pertanto, l'inappropriatezza non deriva solo dal momento prescrittivo, ma come si può osservare nella Tabella 2, da molte altre problematiche.

**Tabella 2**

*Cause di inappropriatezza in medicina di laboratorio*

Richiesta iniziale inappropriata
Ripetizione inappropriata dell'esame
Raccolta/manipolazione del campione scorretta
Processo analitico scorretto
Validazione dati/refertazione scorretta
Comunicazione del referto scorretta/ritardata
Recepimento/interpretazione dell'informazione ritardati/errati

La Tabella 3 illustra alcune possibili semplici cause di richiesta inappropriata.

**Tabella 3**

*Cause di inappropriatezza nella richiesta*

Cause di errore	Esempio
Paziente	Richiesta di antigene prostatico specifico (PSA) in una donna
Esame	Fattore V Leiden in soggetto con resistenza alla Proteina C attivata nella norma
Tempistica	Emoglobina glicata ripetuta a distanza <90 giorni
Processo	Campione raccolto con anticoagulante scorretto Risultato analitico non conforme rispetto alle specifiche di qualità

Il tema dell'appropriatezza, o meglio dell'inappropriatezza, in senso globale e particolarmente nei confronti della sicurezza per i pazienti, ha ricevuto recentemente molta attenzione, sia nell'ambito della medicina in generale (Figura 1), che nella medicina di laboratorio (5,18). Secondo Epner et al. (19), l'errore diagnostico può derivare da 5 fonti di inappropriatezza, come illustrato nella Tabella 4.

**Tabella 4**

*Cause di errori diagnostici per inappropriatezza*

Richiesta di esame inappropriato
Mancata richiesta di un esame appropriato
Errata interpretazione/utilizzazione del risultato di un esame inappropriato
Ritardo nel processo di laboratorio di un esame appropriato
Risultato sbagliato (non accurato) di un esame appropriato

È, quindi, evidente la necessità di un approccio "olistico" al tema dell'appropriatezza, che spazi in tutto il ciclo dell'esame di laboratorio, al fine di garantire che l'informazione finale sia in grado di rispondere ai quesiti clinici, e possa migliorare la qualità della diagnosi e dell'azione terapeutica. Se questo è vero, è altrettanto importante partire dalla fase pre-pre-analitica, ossia assicurare appropriatezza nella richiesta/prescrizione degli esami di laboratorio (20-22).

### Inappropriatezza prescrittiva

Alla domanda "conosciamo realmente l'inappropriatezza nelle richieste di esami di laboratorio?", riesce davvero difficile rispondere con certezza. Infatti, a prescindere dalla cospicua letteratura scientifica che riporta un tasso di inappropriatezza variabile fra il 5 ed il 95%, il disegno di molti studi e la tipologia di esami valutati non permette una risposta definitiva. Nella recente metanalisi pubblicata da Zhi et al. (23), che ha preso in esame i lavori pubblicati negli ultimi 15 anni (fino al 2013), si è evidenziato un maggiore tasso di sottoutilizzo (44,8%) rispetto al sovrautilizzo (20,6%) della richiesta di esami di laboratorio, anche se va sottolineato che i lavori che avevano preso in esame il sottoutilizzo rappresentano solo un quinto di quelli che hanno valutato il sovrautilizzo, a dimostrazione che questo problema è "importante, poco apprezzato e analizzato". Gli autori del lavoro sottolineano la differenza fra due termini spesso utilizzati come sinonimi, cioè "inappropriato" e "sovrautilizzato", che identificano situazioni diverse. "Inappropriato" è, per esempio, richiedere la ripetizione giornaliera dell'elettroforesi proteica senza tenere in considerazione la situazione clinica; è più corretto, invece, definire "sovrautilizzata" la richiesta di un esame (ad esempio il D-Dimero in caso di elevata probabilità pre-test di embolia polmonare), senza considerare se il risultato

possa modificare sostanzialmente la probabilità pre-test. Un altro importante messaggio di questo lavoro è che il tasso di sovrautilizzo è risultato molto superiore (29%) quando valutato con criteri soggettivi, rispetto a quello (16%) valutato con criteri oggettivi, e tre volte più elevato nel caso fossero usati criteri restrittivi (44%) rispetto a criteri più permissivi (12%). Altri importanti messaggi di questo lavoro sono che il sovrautilizzo nelle "prime" richieste è sei volte superiore a quello delle ripetizioni (43,9% versus 7,4%), ed incide maggiormente nel caso di esami a bassa numerosità (32,2%) rispetto a quelli ad elevata numerosità (10,2%). Si è visto, quindi, che l'inappropriatezza varia in modo sistematico a seconda del contesto, del volume di esami (tipologia), e dei criteri di valutazione; ma, è del tutto evidente che sono necessari studi ulteriori che facciano tesoro dei risultati ottenuti per migliorare il disegno e ridurre possibili fonti di errore (24-26).

#### Strategie per migliorare l'appropriatezza prescrittiva

Poiché la tematica dell'appropriatezza è complessa, e le ragioni dell'inappropriatezza sono molteplici, interagiscono fra loro e comportano interventi a vari livelli e con vari attori, ne risulta che le strategie proposte ed utilizzate per migliorare l'appropriatezza sono numerose (27-29). Plebani e Panteghini (21) in un lavoro abbastanza recente hanno riassunto le principali, come elencato in Tabella 5.

**Tabella 5**

*Strategie per migliorare l'appropriatezza prescrittiva*

Interventi educativi
Consulenza/informazione sul punto di cura
Sviluppo e disseminazione di linee-guida
Utilizzazione di reflex e reflective test
Dismissione di esami obsoleti
Politiche di gating (specialmente per esami complessi costosi)
Razionalizzazione delle ripetizioni (intervallo minimo per la ripetizione)
Feedback a tempistiche regolari sui dati di attività e costi

#### Interventi educativi

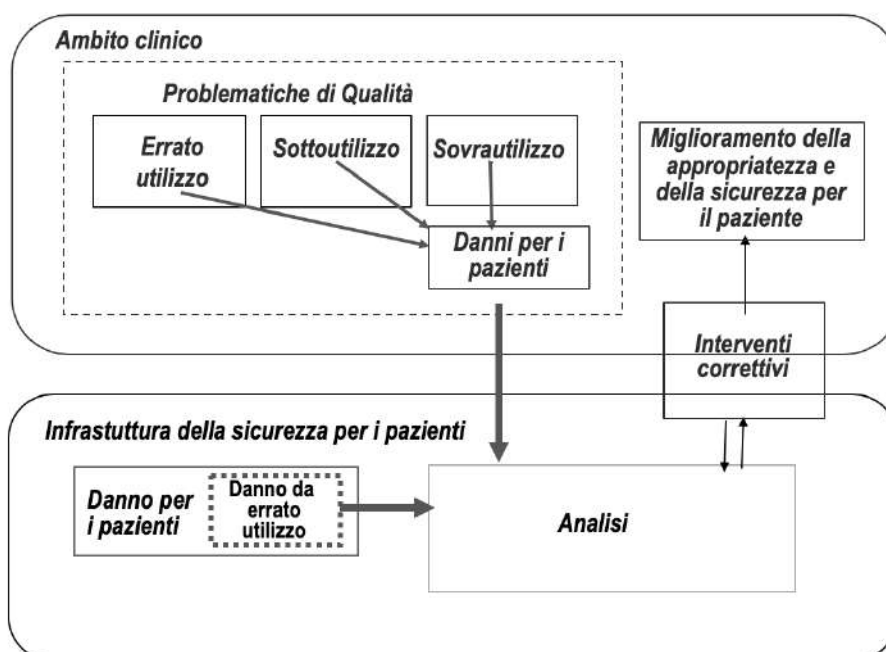
Si ritiene che parte dell'inappropriatezza prescrittiva derivi da mancata/scarsa conoscenza, e questo fenomeno è andato aumentando negli ultimi anni per lo sviluppo della disciplina e l'introduzione di esami innovativi e complessi.

Le conoscenze necessarie per una buona appropriatezza prescrittiva sono le seguenti:

- Significato clinico dell'esame
- Scelta appropriata in base all'ambito/situazione clinica
- Gravità della diagnosi mancata/ritardata
- Conseguenze della richiesta di un esame non necessario
- Costo del test

**Figura 1**

*Problematiche relative alla qualità in Medicina.*



Vi è ampia convergenza sulla necessità dell'interazione fra professionisti del laboratorio e clinici per migliorare queste conoscenze e sulla condivisione di strumenti quali Lab Tests Online (<https://labtests.online.it>), progetto inizialmente sviluppato dall'American Society of Clinical Chemistry (AACC) e introdotto in Italia da SIBioC che fornisce informazioni di base ma scientificamente corrette sugli esami di laboratorio al fine di suggerire "l'esame giusto per il paziente giusto, da richiedere per il quesito appropriato ed al momento appropriato". Ma certamente l'organizzazione di eventi scientifici, congressi e altre iniziative collaborative con il mondo della clinica possono migliorare competenze e conoscenze (30).

#### *Consulenza/informazione sul punto di cura*

L'accesso in tempo reale per il prescrittore a fonti di informazione che supportino e migliorino la richiesta di esami sulla base di sintomatologia, condizione morbosa ed altre informazioni cliniche rappresenta uno strumento interessante che ha assunto nomi diversi, quali i sistemi di supporto alla decisione clinica (Clinical Decision Support Systems - CDSS/CDST), rule-based algorithms (26) e altri.

#### *Sviluppo e diffusione di linee-guida e raccomandazioni*

Nella definizione di appropriatezza ha certamente un peso rilevante l'aderenza ad una fonte di raccomandazione, in particolare ad una linea-guida. Tuttavia, è ben nota la differenza esistente rispetto alle prove di efficacia fra il mondo del farmaco e la diagnostica di laboratorio. In particolare, nella medicina di laboratorio molte linee-guida sono basate su metodi di consenso (tecnica di Delfi e/o conferenze di consenso) piuttosto che su risultati di studi controllati e randomizzati. Pertanto, in assenza di linee-guida emanate a livello internazionale o nazionale, è importante sviluppare a livello locale delle raccomandazioni che permettano di identificare progetti di miglioramento dei comportamenti e l'adesione a modalità operative consensualmente identificate. A seguito del decreto Legge 24 dell' 08.03.2017 (altresì noto come riforma "Gelli-Bianco" e pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale del 17.03.2017), il Ministero della Salute ha istituito un elenco delle Società Scientifiche e Associazioni Tecnico-Scientifiche delle Professioni Sanitarie, abilitate a produrre linee-guida cui medici e altri operatori sanitari dovranno attenersi nello svolgimento della propria attività, in attuazione dell'articolo 5 della suddetta Legge e del conseguente Decreto Ministeriale del 02.08.2017. Nell'elenco risultano oggi iscritte 293 Società e Associazioni che hanno superato la valutazione amministrativa, avendo presentato uno statuto aggiornato successivamente all'entrata in vigore del Decreto Ministeriale e fra queste, ovviamente, è inserita SIBioC. (Ministero della Salute. Elenco delle società scientifiche e delle associazioni

tecnico-scientifiche delle professioni sanitarie, iscritte 293 società e associazioni. Disponibile a: [http://www.salute.gov.it/portale/news/p3\\_2\\_1\\_1\\_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=3532](http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=3532). Ultimo aggiornamento: 11 Gennaio 2019).

#### *Utilizzo di test riflessi*

L'utilizzo dei test rilesi (*reflex testing*) è ben conosciuto e praticato in numerosi laboratori clinici come strumento di appropriatezza. Gli esempi più noti sono il suo utilizzo nella diagnostica delle patologie tiroidee nella quali un valore di tirotropina (TSH) aumentato/diminuito genera la determinazione automatica di free T4 (ed eventualmente degli anticorpi anti-perossidasi ) (28), ed analogamente per il PSA totale nei confronti del PSA libero, ed in altri numerosi casi.

#### *Dismissione di esami obsoleti*

Visto il continuo sviluppo delle conoscenze e l'introduzione di una generazione di esami di laboratorio più accurati dal punto di vista diagnostico, diviene essenziale dismettere esami obsoleti e scarsamente informativi per evitare ridondanze e costi ingiustificati. E' il caso ad esempio degli "enzimi cardiaci", che non hanno più alcuna indicazione clinica nell'era delle troponine cardiache, specie se determinate con metodi ad elevata sensibilità, così come anche di alcuni autoanticorpi nella diagnostica della celiachia dopo l'introduzione degli anti-transglutaminasi e, ancora, dell'amilasi totale in caso di pancreatite acuta e di molti altri misurandi in svariate condizioni cliniche.

#### *Politiche di gating*

Il "gating" consiste nell'autorizzare la richiesta di alcuni esami (complessi e costosi) solo nel caso di sospetto diagnostico di una serie limitata di condizioni cliniche e solo se la richiesta è corredata da precise informazioni cliniche (come specifici sintomi, esami precedenti, ecc.). È evidente che questo intervento comporta l'utilizzo di un sistema informativo sofisticato, ma soprattutto la definizione, consensualmente raggiunta con i Clinici, di quali siano le condizioni cliniche nelle quali la richiesta diviene appropriata e la sua conseguente validazione da parte del professionista di laboratorio.

#### *Razionalizzazione delle ripetizioni (intervallo minimo per la ripetizione)*

La ripetizione di esami è pratica molto comune e rappresenta una componente significativa delle richieste complessive e dei costi relativi. Molto spesso, però, le tempistiche e la frequenza delle ripetizioni non sono basate su criteri oggettivi relativi alle proprietà dell'esame, quali l'emivita del misurando e/o il contesto clinico nel quale viene richiesto. Il *National Minimum Re-testing Interval Project*, che è stato curato

dall'Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine (ACB) e dal Royal College of Pathologists (29), ha fornito un preciso punto di riferimento per le iniziative volte a ridurre l'inappropriatezza nella ripetizione di esami grazie all'identificazione dell'intervallo minimo raccomandato. Numerose esperienze supportano l'utilità di questo programma, gestito facilmente dai sistemi informatici di laboratorio, per ridurre il numero e la tipologia di ripetizioni non appropriate.

#### *Feedback a tempistiche regolari sui dati di attività e costi*

I sistemi di resoconti periodici e regolari che informino i clinici sull'andamento dell'attività (richieste ed esami eseguiti) e sui costi che ne derivano è uno strumento utilizzato in molte istituzioni per sensibilizzare i clinici a rispettare le linee-guida e i documenti di consenso, definiti anche a livello locale. Alcuni lavori hanno evidenziato come la segnalazione dei clinici che richiedevano un maggior numero di esami ha avuto come effetto una riduzione del 10,7% dei 4 esami più comunemente richiesti, ed in un altro caso la riduzione del 66% della richiesta di calcio ionizzato (27).

#### **Efficacia delle strategie per il miglioramento dell'appropriatezza prescrittiva**

Rubinstein et al. (31) hanno pubblicato lo scorso anno un importante lavoro di revisione sistematica e meta-analisi delle pratiche di miglioramento dell'appropriatezza in medicina di laboratorio, quali ad esempio la richiesta computerizzata (CPOE), i sistemi di supporto alla decisione clinica (CDSS/CDST), la

formazione, i feedback, i test riflessi, la revisione del repertorio analisi, l'istituzione di gruppi di lavoro per l'utilizzo dei test di laboratorio (LTU) e altre attività combinate. Su un totale di 23.231 voci bibliografiche, pubblicate fra Gennaio 1980 e lo stesso mese del 2016, sono risultati eleggibili per l'inclusione nella revisione sistematica 95 studi di cui 12 sono stati eliminati successivamente per scarsa qualità. Sono, perciò, stati inclusi nella revisione sistematica 83 studi, dei quali 32 non sono risultati idonei ad essere meta-analizzati per assenza delle informazioni necessarie. La maggior parte degli studi sono stati condotti in Centri Accademici, Università ed Ospedali di insegnamento e come indicatore di risultato è stata assunta la differenza fra la numerosità di esami prima e dopo l'intervento (basato sulla strategia di miglioramento) o fra il gruppo sottoposto ad intervento e quello di controllo, assumendo come appropriati gli esami richiesti a seguito dell'intervento. Come indicatore di esito secondario è stato calcolato il costo degli esami. La Tabella 6 riassume le raccomandazioni derivate dalla meta-analisi. Come emerge dall'evidenza scientifica, considerato che l'appropriatezza rappresenta un problema complesso, con dimensioni e punti di osservazione diversi, la pratica migliore per efficacia è quella che prevede la combinazione di più strategie. Tutti gli studi svolti con questo approccio hanno dimostrato un effetto positivo e suggeriscono un'efficacia moderata con un odd risk (OR) pari a 0,411,  $p=0,85$ . È bene sottolineare che, come peraltro ammesso dagli Autori, l'esito primario, ossia il numero di esami richiesto dopo l'intervento, è un indicatore debole di esito perché valuta il numero complessivo e non la concordanza degli esami con i criteri di appropriatezza stabiliti. Non è provato, infatti, se

**Tabella 6**  
*Raccomandazioni pratiche*

Attività	Raccomandazione
Inserimento informatizzato delle richieste	È raccomandato come lo strumento pratico più utile per favorire un appropriato utilizzo clinico degli esami di laboratorio
Consulenza/informazione sul punto di cura	Nessuna raccomandazione a favore o contro, a causa delle insufficienti evidenze
Formazione	Nessuna raccomandazione a favore o contro a causa delle insufficienti evidenze che dimostrino come la formazione rappresenti una buona pratica per supportare l'utilizzo clinico appropriato degli esami di laboratorio
Feedback	Nessuna raccomandazione a favore o contro a causa delle insufficienti evidenze
Test riflessi	È raccomandata come una delle migliori attività pratiche a supporto di un appropriato utilizzo clinico degli esami di laboratorio
Revisione del repertorio analisi	Nessuna raccomandazione a favore o contro a causa delle insufficienti evidenze
Costituzione di gruppi di lavoro	Nessuna raccomandazione a favore o contro a causa delle insufficienti evidenze
Attività combinate	L'uso di attività combinate è raccomandato come una delle migliori attività pratiche per favorire l'utilizzo clinico appropriato degli esami di laboratorio

la riduzione del numero di esami sia il risultato dell'eliminazione di quelli ritenuti inappropriati e se siano ancora rappresentati e richiesti esami non appropriati. L'analisi dei costi, come indicatore di esito, ha, inoltre, rivelato numerosi limiti che ne mettono fortemente in dubbio la validità. Un'altra rassegna pubblicata recentemente che presenta un piano di intervento basato sulle prove per ridurre l'inappropriatezza e descrive le strategie già citate in precedenza, propone la stessa conclusione del lavoro di Rubinstein et al.: la combinazione di diverse pratiche rappresenta l'approccio più efficace per migliorare l'appropriatezza (24).

## CONCLUSIONI

Il tema dell'appropriatezza riveste un ruolo sempre maggiore in medicina ed in medicina di laboratorio, in quanto strettamente associato ai concetti di qualità, sicurezza ed anche sostenibilità del Sistema Sanitario. In medicina di laboratorio, ad evitare che questo problema complesso e multidimensionale sia riduttivamente visto come eccesso di domanda, è necessario trasformare una *fake news* in dati oggettivi che derivino da studi con disegni privi di bias. Nell'attuale fase di grande sviluppo della medicina di laboratorio, è indispensabile porre attenzione a questo tema per:

- confutare la visione dell'esame di laboratorio come "merce" (*commodity*);
- sottolineare l'importanza dell'efficienza e dell'efficacia in medicina di laboratorio;
- associare l'attività del laboratorio clinico al miglioramento degli esiti per il paziente;
- sottolineare l'importanza del rapporto fra Medicina di Laboratorio e Medicina Clinica, e della consulenza degli specialisti di laboratorio per migliorare la richiesta ed interpretazione degli esami.

Questo aspetto riveste oggi particolare importanza visto il consenso che sta ricevendo la necessità di implementare la *clinical laboratory stewardship* (32). Il termine, difficilmente traducibile in italiano, sintetizza l'importanza dell'intervento del professionista di laboratorio nella fase iniziale del ciclo per fornire consulenza volta a migliorare l'appropriatezza della richiesta di esami e, nella fase finale del ciclo stesso, per collaborare a migliorare l'appropriata interpretazione ed utilizzazione dell'informazione di laboratorio. Va sottolineato che il tema dell'appropriatezza è stato affrontato da anni da SIBioC sia dal punto di vista teorico che attraverso l'emanazione di linee-guida, diffusione di buone pratiche e pubblicazione di esperienze improntate alla riduzione dell'inappropriatezza che sono state implementate in moltissimi laboratori italiani (33-35). Tuttavia, questo documento ha il valore di riproporre l'attualità di questa tematica e di sottolineare la necessità di una visione "olistica" che privilegi la qualità e la sicurezza di tutte le fasi dell'attività del laboratorio clinico.

Il tema è centrale per il futuro della disciplina e per i professionisti della stessa che sicuramente devono

prendere coscienza dei tempi che cambiano e dei nuovi ruoli ai quali sono tenuti per dare valore e futuro alla disciplina.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Brook R. Assessing the appropriateness of care-its time has come. *JAMA* 2009; 302: 997-8.
2. Porter ME, Larsson S, Lee TH. Standardizing patient outcomes measurement. *N Engl J Med* 2016; 374: 504-6.
3. Porter ME. What is value in health care? *N Engl J Med* 2010;363: 2477-81.
4. Fried TR. Shared decision making-finding the sweet spot. *N Engl J Med* 2016;374:104-6.
5. Lippi G, Bovo C, Ciaccio M. Inappropriateness in laboratory medicine: an elephant in the room? *Ann Transl Med* 2017;5:82.
6. Plebani M, Sciacovelli L, Bernardi D, et al. What information on measurement uncertainty should be communicated to clinicians, and how? *Clin Biochem* 2018;57:18-22.
7. Cadamuro J, Gaksch M, Wiedemann H, et al. Are laboratory tests always needed? Frequency and causes of laboratory overuse in a hospital setting. *Clin Biochem* 2018;54:85-91.
8. Meidani Z, Farzandipour M, Farrokhian A, et al.. A review on laboratory tests utilization: A trigger for cutting costs and quality improvement in health care settings. *Med J Islam Repub Iran* 2016;30:365.
9. van Walraven C, Naylor CD. Do we know what inappropriate laboratory utilization is? A systematic review of laboratory clinical audits. *J Am Med Assoc* 1998;280:550-8.
10. Rao GG, Crook M, Tillyer ML. Pathology tests: is the time for demand management ripe at last? *J Clin Pathol* 2003;56:243-8.
11. Larsson A, Palmer M, Hulten G, et al. Large differences in laboratory utilisation between hospitals in Sweden. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:383-9.
12. Lundberg GD. The modern clinical laboratory; Justification, scope, and directions. *JAMA* 1975; 232: 528-9.
13. College of American Pathologists. Standards for Laboratory Accreditation. 2017 Edition. <https://elss.cap.org/elss/ShowProperty?nodePath=/UCM/CON/Contribution%20Folders/WebApplications/shared-assets/lap-standards.pdf>. (ultimo accesso: Febbraio 2019)
14. Lundberg GD. Changing physician behavior in ordering diagnostic tests. *JAMA* 1998; 280: 2036.
15. Price CP. Application of the principles of evidence-based medicine to laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2003; 333:147-54.
16. Fryer AA, Smellie WS. Managing demand for laboratory tests: a laboratory toolkit. *J Clin Pathol* 2013; 66:62-72
17. Plebani M. Towards a new paradigm in laboratory medicine: the five rights. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54:1881-91.
18. Hauser RG, Shirts BH. Do we know what inappropriate laboratory utilization is? An expanded systematic review of laboratory clinical audits. *Am J Clin Pathol* 2014; 141: 774-83.
19. Epner PL, Gans JE, Graber ML. When diagnostic testing

- leads to harm: a new outcomes-based approach for laboratory medicine. *BMJ Qual Saf* 2013; 22 (suppl 2): ii6-ii10.
20. Cappelletti P. Appropriateness of diagnostics tests. *Int Jnl Lab Hem* 2016;38: 91-9.
  21. Plebani M, Panteghini M.. Promoting clinical and laboratory interaction by harmonization. *Clin Chim Acta*. 2014;432:15-21.
  22. Sciacovelli L, Panteghini M, Lippi G, et al. Defining a roadmap for harmonizing quality indicators in Laboratory Medicine: a consensus statement on behalf of the IFCC Working Group "Laboratory Error and Patient Safety" and EFLM Task and Finish Group "Performance specifications for the extra-analytical phases". *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: 1478-88.
  23. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, et al. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One*.2013; 11:e78962. doi: 10.1371/journal.pone.0078962.
  24. Bindraban RS, Bergen MJ, Naaktgeboren CA, et al. Reducing test utilization in hospital settings; a narrative review. *Ann Lab Med* 2018; 38:402-12.
  25. Ducatman AM, Tacker DH, Ducatman BS, et al.. Quality improvement intervention for reduction of reduction of redundant testing. *Acad. Pathol*.2017; doi: 10.1177/2374289517707506.
  26. Delvaux N, van Thienen K, Heselmans A, et al.. The effects of computerized clinical decision support systems on laboratory test ordering. A systematic review. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141: 585-95.
  27. Eaton KP, Levy K, Soong C, et al. Evidence-Based guidelines to eliminate repetitive laboratory testing. *JAMA Intern Med*. 2017; 12: 1833-9.
  28. Henze M, Brown SJ, Hadlow NC et al. Rationalizing thyroid function testing: Which TSH cutoffs are optimal for testing Free T4? *J Clin Endocrinol Metab* 2017 102: 4235-41.
  29. Lang T, Croal B. National minimum retesting intervals in pathology: A final report detailing consensus recommendations for minimum retesting intervals for use in pathology. <https://www.ibms.org/resources/documents/national-minimum-retesting-intervals-in-pathology>. (ultimo accesso: Febbraio 2019).
  30. Brush JE, Brophy JMB. Sharing the process of diagnostic decision making. *JAMA Intern Med* 2017; doi: 10.1001/jamainternalmed.2017.1929.
  31. Rubinstein M, Hirsch R, Bandyopadhyay K, et al. Effectiveness of practices to support appropriate laboratory test utilization. A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Pathol* 2018; 149:197-221.
  32. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta*. 2019 ;489:49-52.
  33. Pelloso M, Basso D, Padoan A, et al. Computer-based-limited and personalised education management maximise appropriateness of vitamin D, vitamin B12 and folate retesting. *J Clin Pathol*. 2016;69:777-83.
  34. Lippi G, Brambilla M, Bonelli P, et al. Effectiveness of a computerized alert system based on re-testing intervals for limiting the inappropriateness of laboratory test requests. *Clin Biochem*. 2015;48:1174-6.
  35. Lanzoni M, Fornili M, Felicetta I, et al. Three-year analysis of repeated laboratory tests for the markers total cholesterol, ferritin, vitamin D, vitamin B12 , and folate, in a large research and teaching hospital in Italy. *J Eval Clin Pract*. 2017;23:654-61.

## La variabilità preanalitica in coagulazione

**Benedetto Morelli<sup>1</sup>, Barbara Montaruli<sup>2</sup>, Daniela Cabodi<sup>3</sup>, Alice Appiani<sup>4</sup>, Federica Bertone<sup>5</sup>, Valter Conterio<sup>6</sup>, Marta Sofia Demicheli<sup>7</sup>, Emanuela Muccini<sup>8</sup>, Chiara Novelli<sup>9</sup>, Maria Rita Portalupi<sup>4</sup>, Paola Pradella<sup>10</sup>, Simone Prestigio<sup>11</sup> per il Gruppo di Studio Emostasi**

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Synlab Castenedolo, Brescia

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino

<sup>3</sup>Laboratorio Analisi, Ospedale San Giovanni Bosco, Azienda Sanitaria Locale Città di Torino

<sup>4</sup>Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

<sup>5</sup>Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Santa Croce e Carle, Cuneo

<sup>6</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, ASLCN2 Alba-Bra

<sup>7</sup>Laboratorio Studio Malattie Emorragiche e Trombotiche, AO SS. Antonio e Biagio, Alessandria

<sup>8</sup>Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Città della Salute e della Scienza, Presidio Ospedaliero Molinette, Torino

<sup>9</sup>Immunoematologia e Centro Trasfusionale ASST Ovest Milanese, Legnano, Milano

<sup>10</sup>Servizio di Medicina Trasfusionale, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Trieste

<sup>11</sup>Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Ospedale di Ivrea - ASLTO4, Ivrea

### ABSTRACT

**Pre-analytical issues in coagulation testing.** Poor standardization of preanalytic variables influences greatly the reliability of coagulation testing, consuming health care resources and compromising patient outcomes. These variables include patient preparation, sample collection, handling, transportation, processing, and storage until time of analysis: lack of standardized procedures for sample collection accounts for most of the errors encountered within the total testing process. Most pre-analytical problems may arise from system faults and insufficient audit of the operators involved in specimen collection and handling, leading to unsuitable specimens due to misidentification, hemolysis, clotting, inappropriate volume, wrong container, contamination from the infusive route. Detection, acknowledgement and management of pre-analytical variables, is mandatory for delivering accurate laboratory results. The present document, issued by the Study Group on Haemostasis of the Italian Society of Laboratory Medicine, is a summary of the recommendations for standardisation of the pre-analytical phase of the coagulation testing, related to sample collection, transportation, and storage and provides guidance to reduce the effects of pre-analytical issues that can have a significant impact on patient care.

### INTRODUZIONE

Assicurare la qualità totale nella diagnostica di laboratorio rappresenta un requisito necessario per il conseguimento di risultati attendibili. In emostasi, più che in altri settori della medicina di laboratorio, la qualità è determinata dalla fase preanalitica. Il termine "fase preanalitica" descrive tutte le azioni e gli aspetti delle procedure diagnostiche di medicina di laboratorio che avvengono prima della fase analitica. Essa rappresenta pertanto una parte della qualità totale della diagnostica coagulativa e comprende fattori di variabilità che possono intervenire sul campione durante la raccolta di sangue, la preparazione, il trasporto e la conservazione,

e che ne possono alterare il risultato. La mancanza di procedure standardizzate per il corretto trattamento preliminare dei campioni può avere conseguenze cliniche significative sulla gestione dei pazienti, soprattutto quando l'errore coinvolge esami specialistici, spesso considerati diagnostici, ed esami utilizzati per monitorare l'efficacia e la sicurezza delle terapie anticoagulanti. Il controllo delle variabili preanalitiche in coagulazione è essenziale poiché esso ha influenza diretta sulla qualità dei risultati e sulla loro affidabilità clinica. L'accurata standardizzazione della fase preanalitica è di importanza cruciale per ottenere risultati affidabili in questo campo e ridurne gli effetti collaterali

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Laboratorio Analisi Synlab, Via Beato L. Pavoni 18, 25014 Castenedolo (Brescia), Tel 340 7912302, E-mail [benemorelli47@gmail.com](mailto:benemorelli47@gmail.com)

Ricevuto: 19.02.2019

Accettato: 27.02.2019

Pubblicato on-line: 29.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.024

(1-7). Questo documento rappresenta una sintesi delle raccomandazioni più importanti riguardanti l'importanza dei fattori preanalitici per gli esami di coagulazione e, nelle intenzioni degli autori dovrebbe essere uno strumento per aumentare la consapevolezza dell'importanza del costante controllo della variabilità preanalitica in coagulazione.

## PRELIEVO DEL CAMPIONE

Il prelievo di sangue è una delle criticità maggiori della fase preanalitica, soprattutto in coagulazione dove la raccolta di campioni idonei è fondamentale per ottenere risultati attendibili. È quindi necessario che tutti i prelevatori, sia quelli interni costituiti da personale del laboratorio sia quelli esterni, ricevano una formazione adeguata, che consenta loro di conoscere l'impatto che il prelievo ha sulla qualità del risultato analitico e tutte le informazioni necessarie all'esecuzione di un corretto prelievo (1-8).

### Modalità di prelievo

Per gli esami di coagulazione le provette da utilizzare per il prelievo devono essere di vetro siliconato o polipropilene, e devono contenere sodio citrato come anticoagulante. Le provette devono essere sottovuote e marchiate CE.

In accordo con le raccomandazioni EFLM l'etichettatura delle provette deve essere sempre eseguita in presenza del paziente. Malgrado non siano fornite indicazioni univoche, si ritiene altresì opportuno sottolineare che l'etichettatura delle provette andrebbe eseguita prima dell'esecuzione del prelievo. Le etichette devono riportare come minimo: nome completo del paziente, data di nascita, codice numerico univoco e data del campionamento (9-10)<sup>1</sup>.

Il prelievo deve essere eseguito con l'utilizzo di dispositivi sterili e apirogeni, basati su camicia monouso e ago diritto di sicurezza, di cui devono essere sempre verificate, prima del loro utilizzo, data di scadenza e integrità (8). Non è raccomandato l'utilizzo di sistemi *butterfly*, malgrado non siano evidenziabili variazioni significative negli esami di emostasi associate all'uso dei suddetti dispositivi. Il loro utilizzo dovrebbe essere comunque scoraggiato in quanto questi, oltre a possedere un costo superiore ai dispositivi convenzionali, hanno una maggiore probabilità di creare campioni non idonei (scarsi o emolizzati), di attivare la fase di contatto dell'emostasi o indurre aggregazione piastrinica (1,10-12).

Un altro problema importante è rappresentato dal calibro degli aghi utilizzati per il prelievo. Le dimensioni raccomandate sono fra 19 e 21 gauge (G); aghi con calibro troppo piccolo (inferiori a 25 G) o troppo grande (maggiore di 16 G) possono indurre, a causa del delta differenziale delle forze di aspirazione, lisi degli eritrociti

e attivazione piastrinica (11).

Il prelievo deve essere effettuato con il paziente seduto in modo comodo su una poltrona, o sdraiato con il braccio posizionato orizzontalmente o leggermente inclinato verso il basso, ben appoggiato. La poltrona e il letto devono garantire la sicurezza del paziente in caso di perdita di conoscenza (2,8,10,12). La sede di prelievo da preferire è la fossa antecubitale; nel caso non fosse possibile reperire vene agevoli in quel punto, sono accettabili anche prelievi effettuati sul dorso della mano. Scelta la vena da utilizzare, si deve procedere con la disinfezione della cute evitando l'uso di alcool in quanto produce iperemia (2). Il prelievo deve essere eseguito dall'operatore indossando i guanti e rispettando le indicazioni di sicurezza.

L'applicazione del laccio emostatico non deve superare il minuto di permanenza e il paziente può chiudere il pugno (evitando però di aprirlo e chiuderlo) onde facilitare l'identificazione della vena migliore (13). Il laccio emostatico deve essere allentato subito dopo il riempimento della prima provetta allo scopo di evitare l'attivazione piastrinica; la stasi venosa può portare ad emolisi in vitro e determinare emocoagulazione, con conseguente aumento del fibrinogeno e dei fattori della coagulazione II, VII e XII (1,6,8,12).

Qualora sia necessario effettuare prelievi da pazienti con cateteri venosi a permanenza o accessi centrali con infusione, è consigliabile effettuare il prelievo da siti lontani dalla sede dell'infusione onde evitare contaminazioni del campione con soluzioni di infusione presenti nei dispositivi utilizzati. Nel caso non sia possibile prelevare i campioni da siti diversi rispetto a quello di inserzione del dispositivo, se si deve effettuare un prelievo da catetere a permanenza è obbligatorio eliminare i primi di 5-10 mL di sangue o effettuare un lavaggio del dispositivo con soluzione fisiologica per diminuire gli effetti della contaminazione (1,2,6).

Nel caso di prelievi che richiedano l'utilizzo di una siringa classica, è necessario impiegare dispositivi di volume non superiore a 20 mL ed effettuare il trasferimento del campione in provette idonee delicatamente, dopo aver eliminato l'ago, entro il minor tempo possibile e senza dare origine a fenomeni di emolisi (1).

Nel 2017, il Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ha emanato la versione semplificata dell'ordine di prelevamento delle provette (2), atto ad evitare eventuali contaminazioni dovute ad effetto di trascinamento di anticoagulanti diversi rispetto al sodio citrato (1,6,9). L'ordine di prelievo prevede in sequenza la raccolta del sangue in flaconi per emocoltura, provette per esami di coagulazione contenenti sodio citrato, provette per siero con o senza attivatori e con o senza gel siliconico, provette con eparina con o senza gel separatore, provette con EDTA, provette con inibitori della glicolisi, eventuali altre provette (10)<sup>1</sup>. Quando la provetta di coagulazione viene raccolta come prima o unica

<sup>1</sup> Delle raccomandazioni EFLM (10) è disponibile la traduzione Italiana pubblicata su *Biochim Clin* 2019;10.19186/BC\_2019.012

provetta, se viene utilizzato un set per il prelievo di sangue (dispositivi a farfalla), deve essere prelevata una provetta di scarto per prevenire il sotto-riempimento della provetta con conseguente alterazione dei risultati degli esami (1,10,14).

Dopo il prelievo, il campione deve essere miscelato in modo corretto effettuando da 3 a 6 inversioni complete della provetta (secondo le indicazioni della ditta produttrice) onde permettere l'azione efficace dell'anticoagulante. Questa operazione previene la formazione di coaguli e deve essere eseguita evitando scuotimenti o agitazioni vigorose che possono portare ad emolisi, ad attivazione delle piastrine o dei fattori della coagulazione (1,6).

### Variabili da controllare durante la raccolta del campione

Allo scopo di ridurre al minimo le interferenze e la scorretta interpretazione dei risultati di laboratorio degli esami di emocoagulazione, il prelievo di sangue dovrebbe essere effettuato nelle prime ore del mattino, in soggetti a digiuno dalla mezzanotte, che non abbiano fumato e non abbiano effettuato attività fisica nelle due ore precedenti il prelievo (6-10).

La dieta ed il fumo sono fattori che influenzano in maniera significativa un elevato numero di analisi. I pazienti non dovrebbero effettuare il prelievo subito dopo un pasto ricco di grassi allo scopo di evitare la formazione nel plasma di chilomicroni che possono interferire sulla lettura di molti esami di laboratorio. Un pasto leggero non sembra influenzare i risultati degli esami di primo livello della coagulazione.

La caffeina aumenta l'attività fibrinolitica, mentre il cioccolato attiva l'aggregazione piastrinica a causa della teobromina contenuta nel cacao (6,8). L'astensione dal fumo due ore prima del prelievo è consigliata per evitare una possibile stimolazione dell'aggregazione piastrinica (6,8).

L'esercizio fisico influisce sulla concentrazione del fattore VIII e del fattore von Willebrand, determinato sia con metodica immunologica (vWF:Ag) che funzionale (vWF:RCo), in modo significativo fino a 10 ore dopo l'esercizio ed in maniera proporzionale all'intensità dell'esercizio stesso. La fibrinolisi globale aumenta durante l'esercizio ed immediatamente dopo, per tornare normale in breve tempo. La concentrazione del D-dimero aumenta velocemente e perdura su valori superiori alla norma fino ad un'ora dopo la conclusione dell'esercizio fisico (6,8).

Lo stress (per esempio nei bambini irrequieti) dovrebbe essere evitato, se possibile, in tutte le circostanze, in quanto alcuni studi hanno evidenziato un aumento della attività o della concentrazione di alcuni fattori della coagulazione, come il fattore VIII, il fattore von Willebrand, espresso sia come concentrazione immunologica (vWF:Ag) che come attività (vWF:RCo), e il fibrinogeno. Uno stress prolungato sembra poter indurre un aumento anche dei fattori V e IX (6,8).

### Anticoagulante

L'anticoagulante di scelta per il prelievo dei campioni dedicati agli esami di emostasi è il citrato trisodico (biidrato), in quanto solo l'utilizzo di questo anticoagulante consente la ricalcificazione del plasma. Le concentrazioni disponibili in commercio sono due: 3,8% (0,129 mmol/L) e 3,2% (0,109 mmol/L). Le più recenti evidenze della letteratura dimostrano come concentrazioni diverse di anticoagulante possono determinare risultati degli esami coagulativi significativamente differenti. Per quanto concerne la concentrazione dell'anticoagulante nel tubo primario, il documento CLSI H21-A5 (1) raccomanda l'utilizzo di provette contenenti sodio citrato alla concentrazione di 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L). È stato dimostrato come, per la determinazione del tempo di protrombina (PT) ai fini del controllo della terapia anticoagulante orale, il valore di International Sensitivity Index (ISI) assegnato alla tromboplastina dipenda dalla concentrazione del sodio citrato utilizzato per il prelievo. In particolare, concentrazioni maggiori di sodio citrato determinano valori di ISI più bassi della tromboplastina (15). Dati della letteratura dimostrano inoltre, che l'utilizzo di provette contenenti citrato trisodico alla concentrazione di 3,8 % (0,129 mmol/L), determina un prolungamento del PT e del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) e una sottostima del fibrinogeno, perché i valori di riferimento di queste determinazioni sono ottenuti utilizzando campioni con concentrazione 3,2% (0,109 mmol/L) di citrato trisodico (6,16).

Alcuni autori hanno evidenziato un effetto interferente degli ioni magnesio presenti come contaminante del sodio citrato. Esistono in commercio provette a basso contenuto di magnesio e la loro comparazione con provette ad elevato contenuto di ioni magnesio ha mostrato una differenza significativa dei risultati del PT-INR determinato con tromboplastine ricombinanti; questo non avviene con le tromboplastine di estrazione (1). Resta quindi aperto il problema del tipo di anticoagulante utilizzato dall'industria nella determinazione dell'ISI. Infatti, se i campioni utilizzati sono prelevati con sistemi a basso contenuto di magnesio, essi si associano ad un ISI inferiore. Stessa considerazione può essere fatta per i plasmi certificati per la determinazione "locale" dell'ISI, anch'essi non esenti da errori preanalitici (18).

I campioni per gli esami di emostasi, a causa della centralizzazione delle analisi in laboratori *hub*, possono giungere dagli ospedali satelliti *spoke*, già aliquotati e congelati. Un problema emergente è, quindi, il riconoscimento della matrice dei campioni secondari prodotti in centri prelievi decentralizzati. In presenza di risultati dubbi o inattendibili deve essere sempre considerata la possibilità che il campione in analisi non sia plasma citrato ma siero, plasma eparinato o plasma EDTA. Nella Tabella 1 è riportato l'effetto matrice sui principali esami coagulativi (4).

Nel caso di dubbi sulla matrice dell'aliquota in esame

la determinazione di sodio, potassio, cloro, calcio e magnesio consente di distinguere con efficienza pari al 100% il plasma citrato dal plasma EDTA, plasma eparinato o siero (vedi Tabella 2).

### Rapporto sangue-anticoagulante

Un'altra fonte di variabilità preanalitica, che interferisce sensibilmente sulla qualità del risultato, è rappresentata dal riempimento non ottimale della provetta. Campioni insufficienti per quantità sono, infatti, ritenuti non idonei ad essere processati (1).

Il sodio citrato, anticoagulante di scelta usato per gli esami di coagulazione, è presente solo in forma liquida e il rapporto sangue-anticoagulante raccomandato per un corretto riempimento della provetta è di 9 parti di sangue e 1 parte di anticoagulante (9:1). Se questo rapporto è inferiore a quanto raccomandato, il sodio citrato in eccesso provocherà la diluizione del plasma utilizzato nell'esecuzione dell'esame e legherà non soltanto il calcio presente nel campione, ma anche quello introdotto nella miscela di reazione indispensabile alla formazione del coagulo, determinando un

allungamento dei tempi di coagulazione, con risultati dell'esame potenzialmente inaccurati (1,6,19). Analoghe considerazioni possono essere fatte in merito ai campioni ottenuti da soggetti con ematocrito elevato, come viene discusso in un'altra sezione di questo documento. Nel corso degli anni, vari studi sono stati condotti, per valutare il volume minimo necessario per ottenere risultati affidabili, soprattutto per gli esami di screening coagulativo PT e APTT, tenendo in considerazione la concentrazione dell'anticoagulante e le dimensioni dei contenitori. Dai dati della letteratura emerge che, per non alterare in modo significativo i risultati di PT e APTT, il volume minimo di riempimento per provette da 5 mL contenenti sodio citrato 3,8% (0,129 mmol/L) è rispettivamente 80% e 90% del volume nominale, mentre con sodio citrato 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L) il volume minimo richiesto è decisamente più basso, rispettivamente il 60% e 70% del volume totale (16). Anche la capacità delle provette può influire sui risultati dell'esame. È stato più volte riportato che, con provette da 3,6 mL contenenti sodio citrato 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L), il volume minimo di riempimento richiesto per PT e APTT è rispettivamente 67% e 90%

**Tabella 1**

*Effetto matrice sui principali esami coagulativi.*

Esame	Sodio citrato (3,2%; 0,109 mmol/L)	EDTA	Sodio eparina	Siero
Tempo di protrombina (secondi)	11,5-13,2	19-27	ND	ND
Tempo di tromboplastina parziale attivato (secondi)	25-33	45-92	ND	ND
Fattore V (%)	84-142	39-103	59-103	13-33
Fattore VII (%)	50-180	51-182	43-107	80-437
Fattore VIII (%)	80-202	2-19	<1	1,3-7,7
F IX (%)	97-148	63-168	<1	135-565
vWF:Ag (%)	50-194	59-228	42-98	32-169
vWF:RCo (%)	41-188	46-215	13-60	25-124
Proteina C coagulativa (%)	66-155	100-205	<1	0-70
Proteina S coagulativa (%)	73-119	17-42	<1	0-39,5
Proteina S libera antigene (%)	72-144	91-171	94-159	97-164
Antitrombina (%)	86-118	105-138	108-143	30-65

*Tabella modificata dal riferimento 4. Intervalli di valori ottenuti su 10 volontari sani; campioni prelevati con additivi differenti. ND, non determinabile; vWF:Ag, fattore von Willebrand antigene; vWF:RCo, attività di cofattore ristocetinico del fattore von Willebrand.*

**Tabella 2**

*Concentrazione sodio, potassio, calcio, cloro e magnesio misurati sul plasma ricavato da provette con sodio citrato ed EDTA rispetto alle provette per siero o con sodio eparina.*

	Sodio citrato (3,2%; 0,109 mmol/L)	EDTA
Sodio	↑↑↑	↓↓↓
Potassio	↓↓	>14 mmol/L
Calcio	↓↓	Indosabile
Cloro	↓↓	↓↓↓
Magnesio	↓↓	Indosabile

(3). È peraltro possibile che gli effetti conseguenti all'insufficiente riempimento possano dipendere anche dal materiale di cui è costituita la provetta, dal suo diametro interno, dallo spazio vuoto residuo dopo il riempimento, oltre che dalla composizione dei reattivi in uso (5,16). In ogni caso, non è stato finora identificato alcun modello matematico che consenta la valutazione del bias dei risultati in base alla riduzione del volume di sangue nelle provette (20).

Il documento CLSI H21-A5 (1) indica come processabili per tutti gli esami di coagulazione solo i campioni raccolti in sodio citrato 3,2% (0,109 mmol/L) contenenti almeno il 90% del volume previsto. Dati della letteratura più recenti suggeriscono l'adozione di misure meno stringenti, raccomandando che le provette di coagulazione siano riempite per almeno l'80% del loro volume nominale, senza distinzione per i singoli esami, allo scopo di non creare confusione quando sono richiesti contemporaneamente esami con diversa tolleranza nei confronti della carenza di volume (5,20). Un caso particolare è costituito dalle provette pediatriche, che sono spesso utilizzate anche per il controllo del PT-INR nei pazienti in terapia anticoagulante orale con antagonisti della vitamina K. In

questi casi bisogna porre attenzione all'esigua quantità di sangue prelevata; il volume minimo di riempimento consigliato è almeno il 90% del volume nominale (22).

È anche possibile un difetto di riempimento in senso contrario, cioè che un campione contenga un volume superiore al previsto, come può accadere quando il sangue è aggiunto alla provetta mediante una siringa e non sfruttando il vuoto. Anche in questo caso il rapporto tra l'anticoagulante e il sangue è inadeguato, e può portare all'attivazione dei processi coagulativi nel campione a causa del calcio residuo non legato dal sodio citrato presente in quantità insufficiente (18).

Poiché la quasi totalità degli studi condotti sull'effetto della diluizione riguarda gli esami coagulativi di primo livello, mentre sono pochissimi i dati in letteratura in merito agli esami di approfondimento (come ad esempio la determinazione dei fattori procoagulanti e degli inibitori naturali o ricerca del Lupus Anticoagulant), il GdS Emostasi di SIBioC suggerisce che l'esecuzione degli esami specialistici di coagulazione sia riservata a campioni raccolti in modo da garantire almeno il 90% del volume di riempimento previsto dalla tipologia della provetta.

#### Raccomandazioni per il prelievo di sangue

- Usare provette in vetro silconato o polipropilene.
- L'anticoagulante da utilizzare deve essere il sodio citrato alla concentrazione 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L).
- Il prelievo deve essere effettuato nelle prime ore del mattino, con il paziente a digiuno dalla mezzanotte.
- Il paziente non dovrebbe essere stato sottoposto a sforzi fisici o psichici intensi nelle ore precedenti il prelievo.
- Riportare sulle etichette delle provette almeno: nome e cognome del paziente, data di nascita del paziente, data del prelievo, numero identificativo della provetta.
- Effettuare il prelievo sulla faccia volare dell'avambraccio in prossimità della fossa antecubitale.
- Il calibro dell'ago deve essere compreso fra i 19 e 22 G.
- Evitare l'utilizzo di aghi cannula in quanto possono più facilmente indurre emolisi.
- Il laccio emostatico non dovrebbe essere mantenuto più di 1 minuto in quanto la stasi venosa può alterare tutti i parametri coagulativi.
- L'ordine di prelievo prevede in sequenza:
  - flaconi per emocoltura
  - provette per esami di coagulazione contenenti sodio citrato
  - provette da siero con o senza attivatori e con o senza gel silconico
  - provette con eparina con o senza gel
  - provette con EDTA
  - provette con inibitori della glicolisi
  - eventuali altre provette
- Dopo il prelievo mescolare delicatamente il campione, effettuando da 3 a 6 inversioni della provetta (seguendo le istruzioni del produttore) onde consentire l'azione efficace dell'anticoagulante. Evitare scuotimenti o agitazioni vigorose che possono portare ad emolisi, ad attivazione delle piastrine o dei fattori della coagulazione.
- Nel caso di prelievo da catetere a permanenza è obbligatorio eliminare i primi 5-10 mL di sangue o utilizzare per prime provette per siero (se richieste).
- Per tutti gli esami di coagulazione, sono accettabili solo i campioni contenenti almeno il 90% del volume previsto. Tuttavia per alcuni esami [PT, APTT, tempo di trombina (TT), fibrinogeno e antitrombina] si possono tollerare riempimenti leggermente inferiori, ma non oltre il limite di 80% del riempimento.
- Per i campioni provenienti già aliquotati da centri prelievi o ospedali decentralizzati, in caso di risultati dubbi o inattendibili (vedi tabelle 1 e 2) si raccomanda l'esecuzione del PT e del TT. Se il PT è incoagulabile e il rapporto del TT è >1,20 si può sospettare la presenza di un coagulo nel campione o una matrice non idonea (siero o sodio eparina) nel primo caso e contaminazione eparinica nel secondo. Si può eventualmente ricorrere alla determinazione anche di sodio/potassio/calcio/cloro e magnesio nel plasma per distinguere il plasma citrato dal plasma EDTA.

## Ematocrito

Il rapporto standardizzato fra anticoagulante e sangue è di 1:9. In questo modo si ottiene, in un campione di sangue intero con ematocrito (HT) di 0,40 L/L, un rapporto anticoagulante/plasma di circa 1:6,4 che è ottimale nei confronti della successiva ricalcificazione. Questo rapporto è critico e può essere fonte di significativa variabilità del risultato, specialmente nei pazienti anticoagulati. I motivi più frequenti di un errato rapporto sono gli eccessi o più spesso i difetti di riempimento della provetta e le alterazioni marcate dell'HT. Nei campioni con elevato HT (>0,55 L/L), il rapporto tra sangue e anticoagulante è inferiore a 9:1; ciò comporta una sovracitratazione del campione che causa un eccessivo legame del calcio per effetto della diluizione dell'anticoagulante. La sovracitratazione del campione e la eccessiva diluizione portano a significativi allungamenti dei tempi di formazione del coagulo, determinando prolungamento degli esami di screening e diminuzione delle misure dei fattori procoagulanti (23). Al contrario, valori di HT fortemente diminuiti (<0,20 L/L) determinano ipocitratazione del campione con accorciamento dei tempi di coagulazione ed espongono al rischio di coagulazione in provetta, prima dell'analisi (24). Mentre non vi sono indicazioni di aggiustamento della quantità di anticoagulante per i campioni di pazienti con HT <0,20 L/L, tutte le raccomandazioni (1,6,25) sono invece d'accordo sulla necessità di operare un aggiustamento della quantità di sodio citrato se HT è >0,55 L/L.

Per calcolare la quantità di sodio citrato da utilizzare nel caso di pazienti con ematocrito >0,55 L/L possono essere utilizzate formule o nomogrammi (1,5,23-26).  
- Formula di Ingram (5):

$$X = [(1-HT)/(5,95-HT)] \times V$$

dove X è il volume, in mL, di sodio citrato e V è il volume della provetta.

- Formula di McGann (1):

$$X = (1,85 \times 10^{-3}) \times (1-HT) \times (V)$$

dove X è il volume di citrato nella provetta, V il sangue che viene aggiunto e  $1,85 \times 10^{-3}$  è una costante.  
- Nomogramma consultabile nella appendice del documento H21-A5 di CLSI (1). Nel nomogramma sono indicate le quantità di sodio citrato sull'asse delle ordinate, i valori di HT sull'asse delle ascisse e quattro diversi formati di provette (da 10, 5, 2 e 1 mL). Dal nomogramma risulta evidente che in soggetti con valori di HT particolarmente elevati (ad esempio 0,62 L/L), prendendo in considerazione la provetta da 5 mL, la quantità di citrato che deve essere presente nella provetta non è 0,5, ma solo 0,3 mL.

### Raccomandazioni per i campioni con valori di ematocrito >0,55 L/L

Per i pazienti che hanno valori di ematocrito > 0,55 L/L è necessario utilizzare provette contenenti una quantità ridotta di anticoagulante [sodio citrato al 3,2% (0,109 mmol/L)], calcolata secondo una delle modalità sopra riportate.

## TRASPORTO

Dopo essere stati prelevati, i campioni di sangue per gli esami di coagulazione devono essere trasportati in laboratorio. L'immediata centrifugazione e lavorazione costituiscono il modo ottimale di procedere. Poiché non sempre l'organizzazione del lavoro lo consente, sono stati eseguiti numerosi studi atti a valutare la stabilità dei campioni dedicati ai test dell'emostasi. È noto dalla letteratura che l'intervallo di tempo consentito fra il prelievo del campione e l'esecuzione dell'analisi varia in funzione del tipo di esame di coagulazione da eseguire, del tempo che intercorre fra il prelievo e la separazione del plasma dalla parte corpuscolata e della temperatura di conservazione prima e dopo la centrifugazione.

I campioni che dagli ospedali (o centri di prelievo) satelliti giungono ai laboratori degli ospedali centrali vengono spesso inviati non centrifugati. Questo è un enorme vantaggio in quanto i laboratori riceventi possono valutare sulle provette primarie variabili preanalitiche importantissime, quali il corretto riempimento della provetta, la presenza di coaguli, l'entità di HT e l'utilizzo del corretto tipo di anticoagulante per il prelievo (1-7).

Allo scopo di mantenere il massimo livello di integrità, i campioni non centrifugati per l'esecuzione di esami di coagulazione di primo livello dovrebbero arrivare in laboratorio entro 6 ore dal prelievo e entro 4 ore per gli esami di coagulazione specialistica (1-7).

La provetta primaria deve giungere in laboratorio tappata, e come tale deve rimanere fino al momento dell'analisi onde evitare variazioni di pH dovute alla liberazione di anidride carbonica a contatto con l'aria (1-7).

Estremi di temperatura devono essere evitati durante il trasporto delle provette non centrifugate. La conservazione e il trasporto delle provette primarie a temperature di 2-8°C o a diretto contatto con il ghiaccio, determina infatti non solo attivazione delle piastrine e del fattore VII, ma anche una significativa riduzione del fattore VIII e del fattore von Willebrand (1,4,6). Dati della letteratura dimostrano infatti che provette di sangue intero prelevate in sodio citrato e conservate per circa 3 ore a diretto contatto con il ghiaccio portano ad una riduzione fino al 50% del fattore VIII e del fattore von Willebrand, associandosi in questi pazienti ad una diagnosi errata di emofilia A o di malattia di von Willebrand (2,12). La conservazione e il trasporto delle provette primarie a temperature elevate (56°C) porta a perdita di attività da parte di tutti i fattori della coagulazione (4,27).

I campioni di sangue intero devono quindi essere mantenuti a temperatura ambiente (15°-25°C), senza essere sottoposti ad eccessiva agitazione.

Il trasporto mediante posta pneumatica delle provette è generalmente consentito, a patto che il sistema di posta pneumatica non induca una eccessiva vibrazione o shock durante il trasporto, o che le provette siano sottoposte ad una eccessiva forza di gravità nel momento della accelerazione/decelerazione delle

provette o dei bossoli, al fine di evitare attivazione piastrinica (29). I campioni di sangue per gli studi di funzionalità piastrinica non devono essere, quindi, trasportati mediante posta pneumatica a causa della possibile attivazione piastrinica (29,30).

Nelle Tabelle 3 e 4 vengono riportate, per gli esami di primo e secondo livello, le raccomandazioni del documento CLSI H21-A5 (1) e della letteratura più recente sulla stabilità dei campioni di sangue intero (Tabella 3) e del plasma povero di piastrine (PPP) (Tabella 4) a diverse temperature. Nelle Tabelle vengono anche indicate le condizioni di stabilità suggerite dal Gruppo di Studio Emostasi di SIBioC (1, 31-41).

Nel caso in cui gli esami non possano essere eseguiti entro i tempi indicati, è necessario provvedere alla loro conservazione mediante congelamento rapido del plasma (preferibilmente utilizzando azoto liquido). Il

congelamento di campioni di sangue intero non risulta accettabile, poiché esso determinerebbe emolisi massiva.

### Contenitori da utilizzare per la conservazione del plasma

Il contenitore e il volume da utilizzare per la conservazione possono influire sulla stabilità del campione. Le provette devono essere di materiale inerte come polipropilene (da evitare il polistirene che non è adatto a queste determinazioni). Il volume conservato non deve essere superiore a 1 mL con il minor spazio morto possibile onde consentire un congelamento rapido (1,4,6). Possono essere utilizzate provette con il tappo a pressione o a vite, poiché le differenze riscontrate nei risultati degli esami eseguiti dopo scongelamento con le due tipologie di contenitore non appaiono clinicamente rilevanti (11).

**Tabella 3**

*Stabilità dei campioni di sangue non centrifugati.*

Esame	Sangue intero 18-25°C (riferimento 1)	Sangue intero 15-25°C (riferimenti 2-8)	Sangue intero 15-25°C Proposta GdS SIBioC	Sangue intero refrigerato 4°C
Tempo di protrombina	24 ore	24-72 ore	24 ore	NG
Tempo di tromboplastina parziale attivato	4 ore	18-24 ore	6 ore	NG
Tempo di trombina	4 ore	24 ore	24 ore	NG
Attività anti-fattore Xa per determinazione EBPM	4 ore	24 ore	4 ore	NG
Fattori V, VIII	4 ore	24 ore	4 ore	NG
Fattori II, VII, IX, X, XI, XII	4 ore	48 ore	4 ore	NG
vWF:Ag, vWF:RCo	4 ore	24-48 ore	4 ore	NG
Fibrinogeno	4 ore	48 ore-7 giorni	24 ore	NG
D-Dimero	4 ore	48 ore	24 ore	NG
Antitrombina (attività)	4 ore	48 ore-7 giorni	24 ore	NG
Proteina C (attività)	4 ore	48 ore	24 ore	NG
Proteina S (attività)	4 ore	4-6 ore	24 ore	NG
Lupus Anticoagulant e inibitori dei fattori della coagulazione	4 ore	8 ore	6 ore	NG
Farmaci anticoagulanti orali diretti				
Dabigatran (dTT)	NI	2 ore	2 ore	NG
Rivaroxaban (Anti-Xa)	NI	2 ore	2 ore	NG
Apixaban (Anti-Xa)	NI	2 ore	2 ore	NG
Edoxaban (Anti-Xa)	NI	2 ore	2 ore	NG

NG, stabilità non garantita; EBPM, eparine a basso peso molecolare; vWF:Ag, fattore von Willebrand antigene; vWF:RCo, attività di cofattore ristocetinico del fattore von Willebrand; dTT, tempo di trombina su plasma diluito; Anti-Xa, anti fattore X attivato; NI, non incluso.

**Tabella 4**

Condizioni di stabilità del plasma povero di piastrine congelato. Limiti suggeriti dal GdS Emostasi di SIBioC.

Esame	PPP Congelato e conservato a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$	PPP Congelato e conservato a $-70 \pm 2^\circ\text{C}$
Tempo di protrombina	14 giorni	12 mesi
Tempo di tromboplastina parziale attivato	14 giorni	12 mesi
Tempo di trombina	3 mesi	20 mesi
Fattore II, V, VII, X	14 giorni	6 mesi
Fattore VIII, IX, XI, XII	14 giorni	6 mesi
vWF:Ag, vWF:RCo	14 giorni	6 mesi
Fibrinogeno	18 mesi	24 mesi
D-Dimero	24 mesi	24 mesi
Antitrombina	3 mesi	24 mesi
Proteina C	14 giorni	6 mesi
Proteina S	14 giorni	6 mesi
Lupus Anticoagulant	14 giorni	6 mesi
Farmaci anticoagulanti orali diretti		
Dabigatran (dTT)	1 mese	ND
Rivaroxaban (anti-Xa)	1 mese	ND
Apixaban (anti-Xa)	1 mese	ND
Edoxaban (anti-Xa)	ND	ND

PPP, plasma povero di piastrine; vWF:Ag, fattore von Willebrand antigene; vWF:RCo, attività di cofattore ristocetinico del fattore von Willebrand; dTT, tempo di trombina su plasma diluito; Anti-Xa, anti fattore X attivato; ND, non disponibili.

### Modalità di congelamento

Il congelamento deve essere il più rapido possibile e la procedura "gold standard" è rappresentata dall'utilizzo di azoto liquido (4). In alternativa può essere utilizzato un congelatore a  $-70/-80^\circ\text{C}$ . Ottenuto il congelamento, i campioni devono essere conservati preferibilmente a  $-70^\circ\text{C}$  o a temperature inferiori; se non si dispone di un congelatore a questa temperatura è accettabile il congelamento a  $-20^\circ\text{C}$ , che non consente tuttavia una conservazione per tempi lunghi come quelli che si possono ottenere col congelatore a  $-70^\circ\text{C}$  (vedi Tabella 3). L'utilizzo di congelatori a  $-20^\circ\text{C}$  dotati di sistema automatico di scongelamento è fortemente sconsigliato poiché potrebbe indurre attivazione del fattore VII e degradazione degli altri fattori (5,6).

Nel caso in cui sia necessario trasportare le aliquote congelate è possibile utilizzare ghiaccio secco o altro sistema che consenta il mantenimento del campione correttamente congelato.

### Raccomandazioni sul trasporto e la conservazione

#### Provette primarie

- Devono pervenire in laboratorio entro i tempi indicati nella Tabella 3.

- Devono essere trasportate senza subire traumi fisici e conservate a temperatura ambiente ( $15-25^\circ\text{C}$ ) fino al momento del loro processamento.

- Devono essere mantenute tappate fino al momento del loro processamento onde evitare variazioni di pH.

- Il trasporto mediante posta pneumatica è consentito purché non induca una eccessiva vibrazione (da verificare con prove in doppio) ed è comunque sconsigliato per i test di funzionalità piastrinica.

#### Aliquote secondarie di plasma

- Il plasma deve essere preparato secondo le modalità di centrifugazione riportate nel capitolo successivo.

- Utilizzare contenitori di polipropilene.

- Volume massimo delle aliquote: 1 mL.

- Congelare le aliquote il più velocemente possibile e conservarle a -70°C; il congelamento e la conservazione a -20°C non sono altrettanto efficaci e si associano a stabilità significativamente inferiore

- Trasportare le aliquote di plasma in ghiaccio secco o in contenitori atti a mantenere una temperatura di -20°C.

## CENTRIFUGAZIONE

La maggior parte degli esami che indagano l'emostasi deve essere eseguita su plasma povero di piastrine (PPP); solo una piccola parte è eseguita su plasma ricco di piastrine (PRP) (studi di funzionalità piastrinica) o su sangue intero (esami viscoelastici).

La centrifugazione serve ad ottenere un plasma il più povero possibile di piastrine e di microparticelle, in quanto entrambe possono produrre, se presenti, tempi di coagulazione significativamente accorciati (4). Nella maggior parte delle Linee Guida viene definita una soglia massima di  $<10 \times 10^9/L$  piastrine (1,6,42) nel plasma. Per la verifica del corretto funzionamento della centrifuga, la conta piastrinica sul PPP, eseguita con un contaglobuli, deve essere ripetuta periodicamente - ogni 6 mesi secondo la raccomandazione del *French Study Group on Hemostasis and Thrombosis* (GFTH) (42) - e registrata. Alcuni lavori hanno recentemente dimostrato che alcuni esami di base (PT, APTT, fibrinogeno e D-dimero) possono essere eseguiti anche su plasmi contenenti quantità elevate di piastrine ( $>200 \times 10^9/L$ ), purché eseguiti immediatamente dopo la centrifugazione, anche se questi campioni non possono essere poi utilizzati per la preparazione di aliquote secondarie (6,43,44).

Le procedure di centrifugazione devono essere avviate nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo o dell'arrivo in laboratorio delle provette di coagulazione, soprattutto se le analisi vengono eseguite presso laboratori decentrati (*spoke*).

La centrifugazione deve essere eseguita ad una temperatura compresa tra 15 e 25°C (6,43); ciò è tuttavia difficile da controllare, soprattutto nei laboratori con grandi carichi di lavoro. Possono essere usate centrifughe non refrigerate, purché non si surriscaldino al loro interno. In alternativa possono essere usate centrifughe refrigerate impostando la temperatura nell'intervallo sopra indicato (45). Ad ogni modo, tutte le centrifughe utilizzate all'interno di un laboratorio devono rispettare i medesimi criteri (tutte refrigerate o tutte non refrigerate) onde garantire la standardizzazione di questa fase di preparazione del plasma. Devono essere anche evitate temperature troppo basse, perché ciò può determinare attivazione delle piastrine e di alcuni fattori della coagulazione. Nondimeno temperature basse non sembrano inficiare gli esami di primo livello, purché essi vengano eseguiti subito dopo la centrifugazione.

Secondo le procedure suggerite nel citato documento CLSI, le provette devono essere centrifugate a 1 500 g o comunque secondo le indicazioni del produttore (1); velocità più alte sono generalmente

sconsigliate perché ciò può indurre attivazione piastrinica ed emolisi. Tuttavia alcuni studi, che hanno preso in esame velocità più elevate (sino a 11 000 g) e tempi di centrifugazione più corti (sino a 2 minuti) (45,46), hanno dimostrato che non vi sono differenze significative a carico di PT, APTT e fibrinogeno, purché queste determinazioni vengano eseguite entro 10 minuti dalla fine della centrifugazione. In questi casi anche l'aliquotazione in provette secondarie e il congelamento rapido per l'esecuzione successiva di altri esami deve avvenire immediatamente dopo la centrifugazione. Velocità più basse ( $<1 500 g$ ) sono, invece, fortemente sconsigliate perché non in grado di operare una corretta sedimentazione delle piastrine e delle microparticelle.

Nel caso di indicazione sul display della centrifuga della sola indicazione "rotazioni per minuto" (rpm), applicare la formula:

$$RCF (g) = 1,12 \times radius \times (rpm/1000)^2$$

dove, g = Relative Centrifugal Force (RCF), radius = raggio del rotore, rpm = rotazioni al minuto.

Secondo le procedure suggerite dal documento CLSI (1), le provette devono essere centrifugate per almeno 15 minuti. Tuttavia, possono essere utilizzati tempi più brevi, purché associati ad una velocità superiore. Ciò riveste particolare importanza per gli esami da eseguire in regime di urgenza/emergenza (PT, APTT, fibrinogeno e D-dimero) dove i tempi di risposta (TAT) devono essere ridotti al minimo indispensabile. Numerosi lavori sono stati proposti in letteratura, suggerendo di volta in volta 10, 5 sino ad arrivare a 2 minuti a 4 500 g (44-50). Qualora venissero adottati in laboratorio tempi di centrifugazione più brevi di 15 minuti, gli esami di coagulazione devono essere tassativamente eseguiti entro 10 minuti dal termine della centrifugazione e la stessa precauzione deve essere adottata nel caso in cui fosse necessaria la preparazione di aliquote secondarie. La raccomandazione del GdS è quella di utilizzare tempi di centrifugazione non inferiori ai 10 minuti (compatibili con lo stato di urgenza), e questo tempo deve essere impostato su tutte le centrifughe del laboratorio in tutte le situazioni di routine/urgenza/emergenza. Con questo tempo di centrifugazione devono essere preparati non solo i campioni dei pazienti, ma devono essere processati anche i campioni dei soggetti normali che vengono utilizzati per definire gli intervalli di riferimento dei vari esami coagulativi, come suggerisce anche il già citato documento (1).

La velocità della centrifuga deve essere accuratamente controllata specialmente nella fase di arresto (decelerazione) per evitare un brusco arresto con rimescolamento dei campioni (51). La fase di arresto deve avvenire dunque con il freno disinserito.

Per la maggior parte degli esami di coagulazione è sufficiente una sola centrifugazione condotta alla temperatura, alla velocità e per il tempo sopra indicato. Solo per alcuni esami è necessario operare una doppia centrifugazione, onde eliminare completamente la presenza di piastrine o altre microparticelle che possono alterare i risultati degli esami. Per le determinazioni di Lupus Anticoagulant (LAC), per la resistenza alla

Proteina C attivata e per la determinazione dell'attività anti-fattore X attivato è consigliata una doppia centrifugazione a 1 500 g per 15 minuti con decantazione tra una centrifugazione e l'altra (1-6). Per la separazione del plasma devono essere usate pipette automatiche e non pipette di plastica che possono aspirare frammenti piastrinici. Non devono essere utilizzati i filtri nella preparazione del plasma per la determinazione di LAC, in quanto questi possono determinare alterazioni e perdita di attività funzionali di alcuni fattori della coagulazione.

---

#### Raccomandazione per la centrifugazione di campioni

---

La centrifugazione dei campioni deve essere eseguita:

- a temperatura ambiente (tra 15 e 25°C)
  - ad una velocità consigliata di 1 500 g
  - per un tempo non inferiore ai 10 minuti (solo per alcuni esami specialistici sono previste velocità e modalità differenti)
  - col freno disinserito
  - controllando periodicamente (ogni 6 mesi) la conta piastrinica sui campioni di plasma
- 

## INTERFERENZE ANALITICHE

### Ittero e lipemia

Tra le variabili che possono interferire sui risultati degli esami coagulativi, la lipemia e l'ittero incidono su una percentuale di campioni che varia dallo 0,5 al 2,5% a seconda del tipo di laboratorio clinico e del numero di pazienti ricoverati rispetto ai pazienti ambulatoriali (52-54).

La lipemia si manifesta con aumento della torbidità dei campioni dovuta all'accumulo di lipoproteine, specialmente chilomicroni del diametro di 70-1000 nm, mentre le altre lipoproteine di dimensioni minori sembrerebbero meno influenti. Nella maggior parte dei casi la lipemia dipende da una inadeguata temporizzazione del prelievo rispetto al pasto (ad esempio pazienti che accedono ai dipartimenti di emergenza e accettazione), o rispetto alla somministrazione parenterale di emulsioni lipidiche (55).

Al momento non vi sono chiare evidenze bibliografiche che un aumento della concentrazione plasmatica di bilirubina provochi una significativa interferenza funzionale sugli esami coagulativi. Al contrario, dopo il consumo di un pasto ricco di grassi si è osservato aumento acuto dell'attività procoagulante del fattore VII, dovuta soprattutto all'aumento della concentrazione del fattore VII attivato (FVIIa). I pasti ad alto contenuto lipidico hanno anche un effetto transitorio sulla funzionalità piastrinica e potrebbero ridurre l'attività di alcuni fattori della coagulazione (come il FII, FIX, FX, FVII, FVIIa, FXIIa) (56).

Il documento CLSI H21-A5 (1) riferisce di un piccolo

studio su campioni lipemici nel quale si è osservato un accorciamento dei tempi di coagulazione di PT e APTT, e un aumento del fibrinogeno in proporzione variabile dal 10% al 15% (1). Per evitare l'interferenza da parte delle particelle lipidiche, il documento CLSI (1) raccomanda la rimozione dei trigliceridi in eccesso mediante ultracentrifugazione. Altri autori, data l'incompatibilità di tale metodica con la pratica routinaria dei laboratori clinici e i limiti dovuti alla possibile precipitazione delle molecole di maggiori dimensioni quali il fibrinogeno e i complessi fattore VIII-fattore von Willebrand, consigliano la microcentrifugazione ad alta velocità o l'estrazione dei lipidi con solventi organici o l'impiego di soluzioni chiarificanti. A tal proposito tuttavia non esistono studi pubblicati, per cui non si ritiene consigliabile il ricorso a queste pratiche (57).

La presenza di bilirubina e di lipemia interferisce sugli esami di coagulazione con meccanismi vari che dipendono oltre che dalla concentrazione della sostanza interferente, anche dal metodo (coagulativo, cromogenico o immunologico) e dal metodo di rilevazione del coagulo (ottico, elettromeccanico o magneto-meccanico). Ittero e lipemia interferiscono con l'assorbimento nei test immunoturbidimetrici e cromogenici, e possono impedire o ridurre la trasmissione di luce durante la lettura del coagulo utilizzando coagulometri foto-ottici.

Poiché l'iperbilirubinemia e l'iperlipemia interferiscono con le letture ottiche per sovrapposizione delle assorbanze e la lipemia interferisce sulle letture ottiche influenzando la trasmissione della luce, CLSI consiglia di utilizzare per i campioni itterici e/o lipemici preferibilmente metodi per la rilevazione del coagulo di tipo meccanico e/o elettromeccanico (1).

Tuttavia, la recente possibilità sui coagulometri di ultima generazione, di acquisire risultati degli esami coagulativi a diverse lunghezze d'onda, consente di superare i problemi legati alla sovrapposizione degli spettri di assorbimento tipici di ittero e lipemia. Pertanto, la frequenza di campioni con mancata refertazione dei risultati attribuibile ad ittero e lipemia è fortemente diminuita. Nondimeno in presenza di un campione fortemente lattescente o itterico è opportuno segnalare la possibile interferenza sui risultati ottenuti.

Per i metodi cromogenici e immunoturbidimetrici, infine, qualunque sia il metodo di rilevazione del coagulo impiegato nel coagulometro utilizzato, non possono essere escluse interferenze da ittero e lipemia e deve

---

#### Raccomandazioni per i campioni itterici e lipemici

---

##### Metodi coagulativi

- CLSI consiglia di utilizzare per i campioni itterici e/o lipemici preferibilmente metodi per la rilevazione del coagulo di tipo meccanico e/o elettromeccanico.

- La possibilità di acquisire sui coagulometri foto-ottici di ultima generazione i risultati dei metodi coagulativi a diverse lunghezze d'onda, consente di superare i problemi legati ad ittero e lipemia.

- Per i risultati ottenuti sui coagulometri foto-ottici è opportuno segnalare la possibile interferenza da ittero o lipemia sui risultati ottenuti inserendo il seguente commento: *“campione lipemico (o itterico), esame eseguito a lunghezza d'onda dedicata, non si può tuttavia escludere una minima interferenza sul risultato.”*

*Metodi immunoturbidimetrici o cromogenici*

- Refertare segnalando la possibile interferenza da ittero o lipemia sui risultati ottenuti.

quindi essere sempre segnalata la possibile interferenza sui risultati ottenuti (1).

### Emolisi

L'emolisi rappresenta la non conformità più frequente nei campioni di sangue che afferiscono ai laboratori, con una prevalenza relativa del 3,3% (57). L'emolisi può essere attribuita a cause in vivo, di tipo ereditario, acquisito o iatrogeno, come ad esempio in corso di anemia emolitica autoimmune, infezioni severe, coagulazione intravascolare disseminata o reazioni trasfusionali. In questi casi l'emolisi non deve essere attribuita alle modalità del prelievo o alle manipolazioni successive ed è quindi inevitabile (58).

Molto più frequentemente l'emolisi si verifica in vitro, ed è quindi dovuta a problemi che si possono verificare durante la raccolta del campione, la sua manipolazione o il suo trattamento. Nel caso si verifichi durante il prelievo, l'emolisi può essere dovuta a:

- difficoltà nella ricerca dell'accesso venoso o nel prelievo,
- applicazione del laccio per tempi troppo lunghi,
- presenza di vene sottili o fragili,
- utilizzo di aghi troppo sottili (>23 G),
- agitazione troppo vigorosa della provetta,
- esposizione a temperature eccessivamente basse o elevate (<15 o >30°C).

L'esecuzione degli esami di valutazione dell'emostasi prevede l'utilizzo di reagenti diversi per composizione e origine, di metodologie diverse (coagulative, cromogeniche e immunologiche) e, soprattutto, di strumentazioni basate su principi differenti. In particolare, gli strumenti a rilevazione elettromeccanica o magneto-meccanica sono insensibili alle diverse colorazioni prodotte dall'emolisi. Sui coagulometri foto-ottici di ultima generazione sono state recentemente implementate nuove lunghezze d'onda per la lettura della formazione del coagulo, e questo consente di superare le possibili interferenze spettrofotometriche dovute non solo alla presenza dell'emolisi ma anche a quelle attribuibili all'ittero e alla iperlipemia.

Moltissimi studi sono stati eseguiti per stabilire se e in quale misura gli esami dell'emostasi siano inficiati dalla presenza di emolisi. Diversi tipi di approcci sono stati utilizzati per riprodurre l'emolisi in vitro, pochi studi hanno messo a confronto campioni dello stesso paziente con e senza segni di emolisi. Dalla maggior parte degli studi pubblicati si evidenzia che l'emolisi può alterare alcuni esami, sia a causa del rilascio di sostanze di tipo

tromboplastinico sia per l'interferenza spettrofotometrica prodotta dalla emoglobina nei coagulometri di tipo foto-ottico (2). La lisi delle membrane dei globuli rossi induce il rilascio del loro contenuto (enzimi intracellulari, ADP) nel plasma e può portare all'attivazione della coagulazione, con formazione di fattori attivati e di complessi fattori attivatori/inibitori fisiologici della coagulazione, e alla attivazione di altre linee cellulari ematiche (leucociti e piastrine).

Il GdS SIBioC ha portato a termine uno studio sulla incidenza dell'emolisi sui cinque esami principali dell'emostasi (PT, APTT, fibrinogeno, antitrombina e D-Dimero) (59). Lo studio è stato eseguito utilizzando oltre 250 coppie di campioni emolizzati prelevati presso 15 diversi laboratori. I campioni, inizialmente emolizzati, sono stati poi nuovamente prelevati entro 4 ore dal precedente prelievo e se risultavano non più emolizzati venivano processati e poi aliquotati e congelati insieme alle aliquote dei campioni emolizzati. Le analisi dei campioni (emolizzati e non) sono state poi eseguite presso un unico centro e i risultati sono stati elaborati statisticamente. Per lo studio è stato utilizzato un coagulometro foto-ottico dotato di modulo per la lettura degli interferenti (HIL). I reagenti utilizzati sono stati di una unica ditta. I risultati del lavoro collaborativo multicentrico hanno evidenziato che il PT è scarsamente influenzato dall'emolisi in vitro. Al contrario, un impatto sfavorevole più importante dell'emolisi è stato riscontrato sugli altri esami di coagulazione di routine (vale a dire APTT, D-dimero, antitrombina e fibrinogeno), il che suggerisce che questi risultati dovrebbero essere soppressi nei campioni di plasma che presentano significative tracce di emolisi. Le variazioni riscontrate per questi esami sono state sia in termini di allungamento che di accorciamento dei tempi di coagulazione (APTT), come pure si sono registrati incrementi e diminuzioni per le concentrazioni degli altri analiti (fibrinogeno, antitrombina, D-dimero), pur con una prevalenza di accorciamento degli APTT e un incremento dei valori del D-dimero.

### Raccomandazioni per i campioni emolizzati

- Accertarsi che non vi siano possibili cause di emolisi in vivo.

- È possibile refertare solo il PT, segnalando comunque la presenza di emolisi; non è possibile refertare l'APTT, il fibrinogeno, il D-dimero e l'antitrombina soprattutto se i campioni sono significativamente emolizzati (Hb libera nel plasma >0,2 - 0,4 g/L a seconda dei pazienti).

### SCONGELAMENTO

I campioni che non possono essere processati nei tempi consentiti (vedi sopra) e quindi sono stati congelati a temperature tra -20 e -70°C, prima di essere testati, devono essere scongelati velocemente a 37°C utilizzando un bagno termostato a temperatura controllata, per al massimo 5 minuti. Non è consentito scongelare utilizzando altre modalità, quali attendere alcuni minuti a temperatura ambiente o utilizzare il forno

a microonde. L'integrità del campione viene compromessa nel caso in cui non si raggiunga il completo scongelamento, o se si lascia per troppo tempo il campione incubato a 37°C. Dopo lo scongelamento il campione deve essere gentilmente omogenato e miscelato al fine di risospendere gli eventuali precipitati formati durante il congelamento (4,60). L'uso di vortex o basculanti causa una differenza statisticamente significativa sulla concentrazione del fibrinogeno e del fattore VIII (61).

I campioni conservati in ghiaccio secco devono invece essere scongelati, una volta stappati, in un incubatore a 37°C per almeno 15 minuti onde consentire l'evaporazione della CO<sub>2</sub> contenuta nel plasma. Se la CO<sub>2</sub> non viene eliminata dal plasma, essa può indurre falsi allungamenti dei tempi di coagulazione a causa del pH alterato.

I campioni per gli esami di coagulazione possono essere sottoposti ad un solo ciclo di congelamento/scongelamento senza che i risultati risultino inficiati. È stato osservato che multipli cicli di congelamento/scongelamento possono influenzare considerevolmente i valori degli esami. Il fattore V e il VIII, come la Proteina S, perdono di attività nel caso di scongelamenti e congelamenti ripetuti. Per questo motivo si sconsiglia il ricongelamento dei plasmi sui quali devono essere eseguiti esami di coagulazione, in particolare per gli esami dedicati alla misurazione delle attività procoagulanti (determinazione dei fattori) e delle attività inibitorie (determinazione degli inibitori fisiologici) (4,6,60).

#### Raccomandazioni per il congelamento e lo scongelamento

Qualora le determinazioni non possano essere eseguite entro i tempi precedentemente suggeriti per vari motivi (organizzazione interna, ottimizzazione delle risorse, prelievo presso sedi lontane), devono essere preparate delle aliquote di plasma ottenute secondo le procedure di centrifugazione prima elencate.

- Per il congelamento devono essere utilizzate provette di polipropilene con chiusura a pressione o con tappo a vite; la quantità di plasma non deve mai eccedere 1 mL per provetta. La procedura di congelamento deve avvenire in maniera rapida: il metodo di riferimento è l'utilizzo di azoto liquido, in alternativa può essere utilizzato un congelatore a -70/-80°C.

- L'utilizzo del congelatore a -20°C è permesso solo per conservare le aliquote dopo averle congelate rapidamente; in questo caso la stabilità dei campioni è molto inferiore a quella che si può ottenere con un congelatore a -70° (vedi Tabella 4).

- Per il trasporto delle aliquote congelate è possibile utilizzare ghiaccio secco o altri sistemi che permettano di mantenere il campione correttamente congelato. L'utilizzo del ghiaccio secco induce, però, una acidificazione del plasma per diffusione della CO<sub>2</sub> nel campione con formazione di acido carbonico e conseguente abbassamento del pH che si riflette in un allungamento dei tempi di PT e APTT e una diminuzione dei valori di fibrinogeno e proteina C. Questi effetti indesiderati possono essere evitati se il campione trasportato in ghiaccio secco viene successivamente conservato a -80°C per almeno 24 ore o se, in fase di scongelamento, si lascia la provetta senza tappo per almeno 15 minuti a 37°C. La conservazione del campione a -20°C non permette la neutralizzazione dell'acidificazione ed è quindi, in questi casi, sconsigliata.

- Prima del loro utilizzo i campioni devono essere scongelati velocemente a 37°C utilizzando un bagno termostato a temperatura controllata per un tempo massimo di 5 minuti; non è permesso effettuare lo scongelamento utilizzando altre modalità, quali attendere qualche minuto a temperatura ambiente o utilizzare il forno a microonde. L'integrità del campione viene compromessa nel caso in cui non si raggiunga il completo scongelamento o se viene lasciato per troppo tempo incubato a 37°C.

- Dopo lo scongelamento il campione deve essere omogenato e miscelato al fine di risospendere gli eventuali precipitati formati durante il congelamento.

- I campioni possono essere sottoposti ad un unico ciclo di congelamento/scongelamento senza perdere di attendibilità; multipli cicli di congelamento/scongelamento influenzano notevolmente i livelli di attività di fattori procoagulanti e di inibitori fisiologici.

## CONCLUSIONI

Il monitoraggio e la gestione continua degli errori preanalitici sono cruciali per migliorare la qualità della fase preanalitica. Gli sforzi di standardizzazione sono essenziali per controllare e prevenire gli errori e per garantire la qualità degli esami dell'emostasi. A causa dello sviluppo di grandi reti di laboratori, e di un crescente numero di centri prelievi periferici, è necessario introdurre procedure rigorose per tutte le fasi che precedono l'esecuzione di queste indagini, incluse la preparazione del paziente, il prelievo, la manipolazione, la conservazione e il trasporto dei campioni. Queste Raccomandazioni hanno lo scopo di individuare tempestivamente problemi nella fase preanalitica che possono impedire di ottenere risultati accurati e affidabili.

Gli effetti delle variabili preanalitiche sull'affidabilità e sulla coerenza degli esami di coagulazione sono talora ignorati e sottovalutati anche da parte degli operatori del settore. Questo aspetto può e deve essere migliorato, educando i professionisti sanitari che sono coinvolti in tutte le fasi operative, dalla esecuzione del prelievo fino alla firma dei referti.

## RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano sentitamente i componenti del Gruppo Emostasi Piemonte e Valle d'Aosta (GEPAL) e del Gruppo Emostasi e Trombosi Unificato Piemonte e Valle d'Aosta (GETUP) che hanno partecipato alla stesura del documento e il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità extra-analitica per l'attenta revisione del documento stesso.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and

- molecular hemostasis assays; approved guideline. 5th ed. CLSI Document H21-A5. CLSI: Wayne, PA, 2008.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens; CLSI standard GP-41. 7th ed. CLSI: Wayne, PA, 2017.
  3. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:565-75.
  4. Adcock Funk DM, Lippi GL, et al. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:576-85.
  5. Ingram GI, Hills M. The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost* 1976;36:230-6.
  6. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J* 2016 doi: 10.1186/s12959-016-0123-z
  7. Favalaro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012;43:1-10.
  8. Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, et al. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77:153-63.
  9. Cornes M, van Dongen-Lases E, Grankvist K, et al. Order of blood draw: Opinion Paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med* 2017;55:27-31.
  10. Simundic AM, Bolenius K, Cadamuro J et al. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:2015-38.
  11. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17:557-61.
  12. Lima-Oliveira G, Guidi GC, Salvagno GL, et al. Is phlebotomy part of the dark side in the clinical laboratory struggle for quality? *Lab Med* 2012;43:172-6.
  13. Lippi G, Lima-Oliveira G, Guidi GC. Does fist pumping/clenching during venipuncture activate blood coagulation? *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016;27:357-60
  14. Rajmakers MT, Menting CH, Vader HL, et al. Collection of blood specimens by venipuncture for plasma-based coagulation assays: necessity of a discard tube. *Am J Clin Pathol* 2010;133:331-5.
  15. Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M, et al. Assessment of the influence of citrate concentration on the international normalized ratio (INR) determined with twelve reagent-instrument combinations. *Thromb Haemost* 1998;80:258-62.
  16. Adcock DM, David C, Kressin DC, et al. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing dependence on citrate concentration. *Am J Clin Pathol* 1998;109:595-9.
  17. van den Besselaar AM, van Vlodrop IJ, Berendes PB, et al. A comparative study of conventional versus new, magnesium-poor Vacutainer® sodium citrate blood collection tubes for determination of prothrombin time and INR. *Thromb Res* 2014;134:187-91.
  18. Adcock DM, Funk D. Sample integrity and preanalytical variables. In: Kitchen S, Olson JD, Preston FE eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis* 2013: 45-55.
  19. Reneke J, Etzell J, Leslie S, et al. Prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol/L (3.2%) citrate anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1998;109:754-7.
  20. Lippi G, Salvagno G, Montagnana M, et al. The bias of routine hemostasis testing due to underfilling of primary blood tubes is not mathematically predictable. Annual Meeting of the American Association of Clinical Chemistry (AACC), Los Angeles July 2012. *Clin Chem* 2012; (Suppl): A47.
  21. Pretorius L, van Rensburg J, Conradie C, et al. Minimum citrate tube fill volume for routine coagulation testing. *Int J Lab Hem* 2014;36:493-5.
  22. Chuang J, Sadler MA, Witt DM. Impact of evacuated collection tube fill volume and mixing on routine coagulation testing using 2.5-mL (pediatric) tubes. *Chest* 2004;126:1262-6.
  23. Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values *Am J Clin Pathol* 2006;126:400-5.
  24. Siegel JE, SwamiVK, Glenn P et al. Effect (or lack of it) of severe anemia on PT and aPTT results. *Am J Clin Pathol* 1998;110:106-10.
  25. Leblanc RM. Le pré-analytique en hémostasie et les recommandations du Groupe d'études sur l'hémostasie et la thrombose (GEHT). *ScienceDirect*, [https://doi.org/10.1016/S0992-5945\(09\)70113-8](https://doi.org/10.1016/S0992-5945(09)70113-8). (ultimo accesso: Febbraio 2019).
  26. Favalaro EJ, Adcock DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012;43:1-10.
  27. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, et al. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Hemost* 2008; 99:416-26.
  28. Bohm M, Teaschner S, Kretschamr E, et al. Cold storage of citrated whole blood induces drastic time-dependent losses of factor VIII and von Willebrand factor: potential misdiagnosis of haemophilia and von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:1589-90.
  29. Plebani M, Zaninotto M. Pneumatic tube delivery systems for patient samples: evidence quality and quality of evidence. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1245-6.
  30. Dyskiewicz-Korpanty A, Quniton R, Jassine J, et al. The effect of pneumatic tube transport on PFA100 closure time and whole blood aggregation. *J Thromb Haemost* 2004; 2:354-6.
  31. Birri N, Baumgartner D, Conte T, et al. Stability of low molecular heparin and factor X activity in citrated whole blood and plasma. *Br J Haematol* 2011;155:629-31.
  32. Froom P, Barak M. Lupus Anticoagulant testing: analyzing fresh samples after a single centrifugation and after 6-8 hr delay. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:367-70.
  33. Woodhams B, Girardot O, Blanco M, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12:229-36.
  34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Laboratory testing for the lupus anticoagulants; approved guideline, 1st ed.* CLSI Document H60-A. CLSI: Wayne, PA, 2014.
  35. Rimac V, Coen-Herak D. Is it acceptable to use coagulation plasma samples stored at room temperature and 4°C for 24 hours for additional prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, antithrombin, and D-dimer testing? *Int J Lab Hematol* 2017;39:547-81.
  36. Zhao Y, Guofang F Zhang J, et al. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci Rep* 2017;7:12179.

37. Toulon P, Metge S, Hangard M, et al. Impact of different storage times at room temperature of unspun citrated blood samples on routine coagulation tests results. Results of a bicenter study and review of the literature. *Int J Lab Hem* 2017;39:458-68.
38. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, et al. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009; 31:462-7.
39. Feng L, Zhai Y, Zhai H, et al. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014;4:3868.
40. Kemkes-Matthes B, Fischer R, Peetz D. Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011;22:215-20.
41. McGrail R, Revsholm J, Nissen PH, et al. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. *Thromb Res* 2016; 148:108-10.
42. GFHT. (French Study Group on Hemostasis and Thrombosis). 2015. [http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Documents-GEHT/Variables-Preanalytiques/Recommandations-Variabes-preanalytiques\\_69\\_722.html](http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Documents-GEHT/Variables-Preanalytiques/Recommandations-Variabes-preanalytiques_69_722.html)
43. Adcock DM, Favaloro EJ, Lippi G. Critical pre-examination variables in the hemostasis laboratory and their quality indicators. *Clin Biochem* 2016;49:1315-20.
44. Suchsland J, Friedrich N, Grotevendt A, et al. A. Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:1187-91.
45. Pappas AA, Palmer SK, Meece D, et al. Rapid preparation of plasma for coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:816-7.
46. Nelson S, Pritt A, Marlar RA. Rapid preparation of plasma for STAT coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:175-6.
47. Boudaoud L, Divaret G, Marie P, et al. Rapid centrifugation for routine coagulation testing. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006;64:315-7.
48. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:525-8.
49. Sultan A. Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. *East Mediterr Health J* 2010;16:233-6.
50. Boissier E, Sévin-Allouet M, Le Thuaut A, et al. A 2-min at 4500 g rather than a 15-min at 2200 g centrifugation does not impact the reliability of 10 critical coagulation assays. *Clin Chem Lab Med* 2017;55: e118-e121.
51. Daves M, Giacomuzzi K, Tagnin E, et al. Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:292-5.
52. Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, et al. Prevalence and type of preanalytical problems for inpatients samples in coagulation laboratory. *J Eval Clin Pract* 2008;14:351-3.
53. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, et al. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem* 1989;35:837-9.
54. Goswami B, Singh B, Chawda R, et al. Evaluation of errors in a Clinical Laboratory: a one-year experience. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:63-6.
55. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med* 2014;24:57-67.
56. Lippi G, Plebani M, Favaloro E. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Sem Thromb Haemost* 2013;39:258-66.
57. Smith MB, Chan YW, Dolci A et al. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Hemolysis, Icterus and Lipemia/turbidimetry. Indices and indicators of Interferences in Clinical laboratory Analysis: Approved Guideline. CLSI Document C56-A. Wayne USA:2012.
58. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolized specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem* 2000;46:306-7.
59. Novelli C, Vidali M, Brando B, et al. A collaborative study by the Working Group on Hemostasis and Thrombosis of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) on the interference of haemolysis on five routine blood coagulation tests by evaluation of 269 paired haemolysed/non-haemolysed samples. *Biochem Med (Zagreb)* 2018. doi: 10.11613/BM.2018.030711.
60. Gosselin RC, Honeychurch K, Kang HJ, et al. Effects of storage and thawing conditions on coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2015;37:551-9.
61. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, et al. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem* 2016; 49:1399-401.

## Interferenza da biotina negli immunodosaggi: raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA)

Giuseppe Lippi<sup>1,2</sup>, Graziella Bonetti<sup>1,3</sup>, Annalisa Modenese<sup>1,4</sup>, Andrea Padoan<sup>1,5</sup>, Davide Giavarina<sup>1,6</sup>,  
per il GdS SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA)

<sup>1</sup>Gruppo di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA)

<sup>2</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Verona, Italia

<sup>3</sup>Laboratorio Centrale di Chimica Clinica, ASST – Spedali Civili, Brescia, Italia

<sup>4</sup>Istituto Clinico Città Studi (ICCS) Milano, Italia

<sup>5</sup>Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università di Padova, Italia

<sup>6</sup>Dipartimento della Diagnostica, Laboratorio Analisi, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia

### ABSTRACT

**Biotin interference in immunoassays: recommendations of the SIBioC Working Group on Extra-Analytical Variability (WG-VEA).** Biotin is a water-soluble vitamin, which participates to a vast array of metabolic pathways involving fatty acids, carbohydrates and amino acids metabolism. This vitamin is also capable to form high-affinity bonds with various molecules, including streptavidin and avidin, which are essential components of many immunoassays based on the principle of biotin-streptavidin or biotin-avidin binding. In patients assuming high doses of biotin, therefore, some competitive and non-competitive immunoassays may exhibit falsely increased and falsely decreased test results, respectively, with magnitude of interference depending on biotin concentration in the test sample and on specific vulnerability of the immunoassay. With the aim to provide some expert guidance for identifying, preventing and managing biotin interference in clinical laboratory practice, this document contains a series of consensus recommendations endorsed by the Working Group on Extra-Analytical Variability of the Italian Society of Clinical Chemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC). Briefly, the most important recommendations encompass local evaluation of possible biotin interference, routine history taking on biotin intake for both inpatients and outpatients, informing clinicians on potentially biotin-sensitive immunoassays, sample retesting 24-48 hours after the last biotin administration, along with possible consideration to add a note in the laboratory report highlighting the methods more vulnerable to biotin interference. Routine biotin measurement in all samples is currently discouraged.

### GENERALITÀ SULLA BIOTINA

La biotina è una vitamina B idrosolubile, nota anche come vitamina B7, vitamina H o coenzima R. Essa è coinvolta in un ampio spettro di processi metabolici, sia nell'uomo e sia in altri organismi, principalmente nel metabolismo di acidi grassi, carboidrati ed amminoacidi (1). Le caratteristiche strutturali della biotina la rendono idonea a legarsi ad altre molecole (processo noto con il termine di "biotinilazione"), alterandone minimamente le proprietà strutturali o antigeniche. La biotina è facilmente disponibile e completamente assorbibile mediante ingestione di una vasta gamma di alimenti di origine animale e vegetale, mentre una piccola parte può essere anche assorbita a seguito di sintesi batterica nell'intestino. Malgrado non siano stati ancora stabiliti con certezza i livelli raccomandati di assunzione della vitamina, alcune indicazioni riportano valori di 0,01-0,02

mg/die alla nascita, 0,02-0,03 mg/die in età pediatrica e 0,03-0,10 mg/die in età adulta. Le restrizioni caloriche sono raramente causa di deficit clinicamente significativi (2). Il picco di assorbimento si registra solitamente dopo 1-3 ore dall'ingestione, il catabolismo è principalmente renale, e la molecola in circolo ha una emivita solitamente compresa tra 8 e 16 ore, mentre il periodo minimo di *wash-out* dalla somministrazione sembra essere di circa 48 ore. Sono noti due metaboliti attivi della molecola, la bisnorbiotina e la biotina sulfossido; quest'ultima mantiene la capacità di legare streptavidina, sebbene con minore affinità rispetto al composto di origine (3).

I sintomi della carenza di biotina comprendono convulsioni, ipotonia, atassia, dermatite, perdita di capelli, ritardo mentale, acidosi chetoacida, aciduria organica e possibili malformazioni fetali (4). Malgrado il deficit di biotina sia estremamente raro (circa 1:60000

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata. Piazza A Stefani, 1, 37126, Verona. E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 18.02.2019

Accettato: 27.02.2019

Publicato on-line: 07.03.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.010

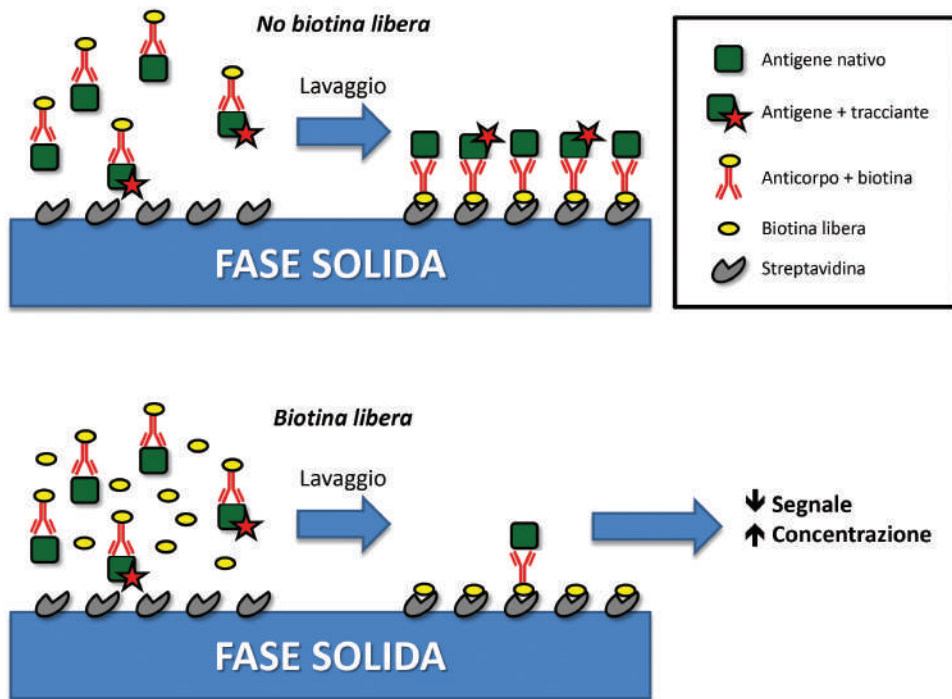
nati vivi) (5), questa vitamina fa comunemente parte di composti multivitaminici. A dispetto di evidenze del tutto aneddotiche, o addirittura discutibili, la supplementazione di biotina come integratore alimentare è oggi particolarmente in voga per il trattamento di alcune patologie, soprattutto cutanee, a carico delle unghie (aumento di spessore, resistenza e flessibilità), dei capelli (prevenzione o trattamento dell'alopecia) o della pelle (maggiore elasticità, trattamento di eritemi, dermatite seborroica e acne) (6). Altrettanto inconcludenti sono le evidenze in merito ai possibili benefici della supplementazione con biotina nei pazienti con sclerosi multipla (7). Le dosi di biotina variano moltissimo in funzione del preparato commerciale (da 5 mg ad oltre 100 mg), ma sono comunque considerevolmente maggiori di quelle suggerite (8).

### INTERFERENZA DA BIOTINA NEGLI IMMUNODOSAGGI

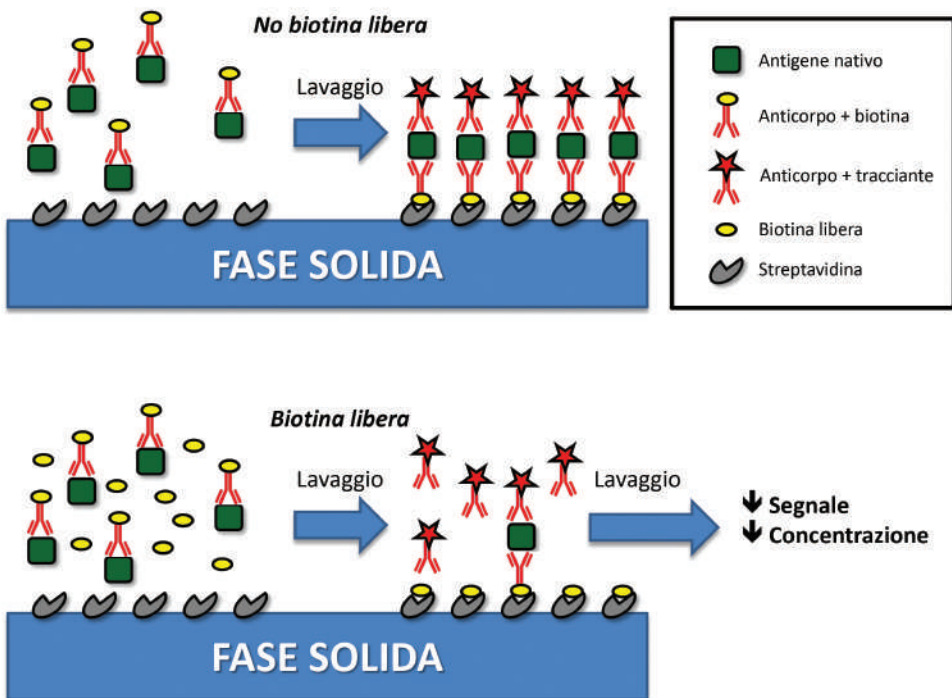
Come descritto in precedenza, la biotina ha la capacità di formare legami ad alta affinità con varie molecole, tra le quali la streptavidina (ed in misura minore) l'avidina, che sono componenti essenziali di molti immunodosaggi, basati per l'appunto sul principio del legame biotina-streptavidina o biotina-avidina (9). In breve, negli immunodosaggi competitivi gli anticorpi mono- o poli-clonali vengono coniugati con biotina e fatti reagire con una miscela di campione del paziente (tipicamente siero o plasma) contenente l'antigene nativo ed un reagente contenente il medesimo antigene coniugato con un tracciante. L'anticorpo biotinilato è quindi catturato da una fase solida, contenente streptavidina (Figura 1). A concentrazioni crescenti di antigene nativo presente nel campione, la quantità di anticorpo legato all'antigene coniugato con tracciante che viene successivamente catturato dalla streptavidina presente sulla fase solida decresce in parallelo, generando quindi un segnale di reazione finale (misurato con tecniche enzimatiche classiche, fluorescenti o chemiluminescenti) che è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo presente nel campione del paziente (Figura 1). Comprensibilmente, in pazienti che abbiano assunto alte dosi di biotina (soprattutto come supplemento alimentare), il legame tra anticorpo biotinilato e la streptavidina in fase solida viene sostanzialmente ridotto (per competizione tra biotina di origine alimentare e biotina coniugata all'anticorpo), generando pertanto un segnale inferiore rispetto a quello che si sarebbe potuto registrare in assenza della biotina assunta come supplemento nutrizionale, e producendo infine una concentrazione misurata dell'antigene falsamente aumentata (Figura 1). Negli immunodosaggi non competitivi (anche noti come *sandwich immunoassays*), in cui l'anticorpo coniugato con biotina compete solo con l'antigene nativo, l'interferenza è comprensibilmente di segno opposto, e cioè una riduzione del segnale per interferenza da biotina si traduce in una falsa diminuzione della concentrazione

dell'antigene in misura (Figura 2) (10,11).

L'ampiezza dell'interferenza varia ovviamente in funzione della quantità di eccesso di biotina nel campione e della soglia di interferenza dello specifico immunodosaggio. Nondimeno, è ragionevole supporre che maggiore sia la concentrazione della biotina libera nel campione, maggiore sia l'interferenza (12). Malgrado la ragione non sia ancora chiara, va altresì ricordato che non tutti gli immunodosaggi basati sul principio biotina-streptavidina sono equamente vulnerabili a questo tipo di interferenza (3). A questo proposito giova menzionare le conclusioni di un recente articolo di revisione sistematica della letteratura, che ha valutato la sensibilità di diversi immunodosaggi all'interferenza da biotina (3). In breve sintesi, sono molteplici le determinazioni immunochimiche eseguite su strumentazione Roche Diagnostics (piattaforme Cobas e411, Elecsys, Cobas e602, Modular E170; Indianapolis, IN, USA) per cui è documentata una possibile interferenza da biotina (assunzione alimentare da 25 a 300 mg una tantum). Essi comprendono la frazione libera T3 (fT3), T4 (fT4), ormone paratiroideo (PTH), tireotropina (TSH), 25OH vitamina D, cortisolo, ormone follicolo-stimolante (FSH), ormone luteinizzante (LH), prolattina (PRL), C-peptide, estradiolo, deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), testosterone, e ferritina. Per alcune determinazioni (ad esempio la 25OH vitamina D) l'interferenza è già presente per una assunzione di biotina >10 mg, per la maggior parte delle determinazioni a dosaggi >100 mg. Per quanto concerne la strumentazione Siemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY, USA), l'interferenza è stata dimostrata in 6 dei 75 immunodosaggi disponibili sulla piattaforma ADVIA Centaur, tra cui ciclosporina, DHEAS, folati, HBc IgM e troponina cardiaca I (cTnI). Per quanto riguarda la piattaforma Dimension Vista, gli esami potenzialmente alterati sono cTnI, TSH e fT3 (per concentrazione plasmatica di biotina  $\geq 300 \mu\text{g/L}$ ), digossina, NT-pro-BNP, TSH, progesterone ed estradiolo (per concentrazione plasmatica di biotina  $\geq 400 \mu\text{g/L}$ ). Per quanto concerne Beckman Coulter (piattaforme Access e Dxl; Brea, CA), sono 4 i metodi per cui è stata descritta una potenziale interferenza da biotina (assunzione di 30 mg, corrispondente ad una concentrazione plasmatica di  $\geq 100 \mu\text{g/L}$ ), e cioè fT4, T3 totale, T4 totale, GI Monitor (CA 19-9 antigen), tireoglobulina. A differenza dei metodi descritti in precedenza, per Abbott (Abbott Park, IL, USA) non è descritta alcuna interferenza da biotina fino ad una concentrazione plasmatica pari a  $100 \mu\text{g/L}$ ; ciò è imputabile al fatto che il metodo utilizzato sulle piattaforme Abbott non utilizza il principio biotina-streptavidina. Infine, per Ortho Clinical Diagnostics (piattaforma Vitros 5600; Rochester, NY, USA), la possibile interferenza da biotina ad una concentrazione plasmatica di  $2,5 \mu\text{g/L}$  è stata descritta per cTnI, a concentrazione plasmatica di  $5 \mu\text{g/L}$  per TSH ed estradiolo, a concentrazione plasmatica di circa  $10 \mu\text{g/L}$  per FSH, LH, PRL, gonadotropina beta umana cronica ( $\beta$ -HCG), antigene carcinoembrionario (CEA), antigene



**Figura 1**  
Possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi competitivi



**Figura 2**  
Possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi non-competitivi

prostatico specifico (PSA), ferritina, folati, progesterone e testosterone.

Alla luce di queste evidenze, la *US Food and Drug Administration* (FDA) ha recentemente emanato una raccomandazione in forma di *safety alert*, atta ad avvertire laboratoristi, clinici e pazienti sulla possibile interferenza da biotina in alcuni esami di laboratorio (13). Purtroppo non esiste ad oggi alcun metodo validato, e certificato dai produttori, per rimuovere l'interferenza da biotina nel campione in esame. I produttori stanno alacremente lavorando per riformulare i loro immunodosaggi affinché questo tipo di interferenza possa essere eliminata, ma non è ragionevole attendersi che ciò possa trovare una rapida conclusione (3).

La determinazione della biotina, soprattutto nei casi sospetti, può essere una possibile strategia. La biotina può essere determinata con vari metodi, alcuni complessi (estrazione e quantificazione microbiologica con *Lactobacillus plantarum*, *avidin-binding assays*, *high pressure liquid chromatography*), altri più semplici (enzimatici fluorimetrici, colorimetrici, ELISA). Nondimeno, la determinazione di routine di questa molecola in tutti i campioni per cui siano previsti esami con possibile interferenza e successiva soppressione dei risultati comporterebbe non solo un aumento considerevole di costi, ma soprattutto un allungamento del tempo di risposta (TAT). Va inoltre ricordato che i

metodi oggi disponibili in commercio sono in grado di determinare concentrazioni di biotina in intervalli di concentrazione per lo più fisiologici, mentre sono altamente imprecisi per elevate concentrazioni dell'analita, come quelle risultanti da elevata supplementazione (ad esempio >100 ng/mL una tantum).

## RACCOMANDAZIONI DEL GRUPPO DI STUDIO

Le raccomandazioni del Gruppo di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica di SIBioC-Medicina di Laboratorio (SIBioC-VEA) in merito alla possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi sono state redatte in accordo al Programma Nazionale per le Linee Guida (PNLG) (14). Esse sono state quindi definite sulla base di un sistema di "grading" corrispondente alla "forza delle raccomandazioni", espresso in lettere maiuscole (forza decrescente da A ad E). Un questionario contenente le raccomandazioni è stato inviato mediante posta elettronica a tutti i membri del GdS SIBioC-VEA, ai quali è stato chiesto di definire il grado di forza (da A ad E) in merito alle singole raccomandazioni. Il grado finale della raccomandazione è stato ottenuto calcolando la media dei singoli giudizi, dopo riconversione della forza di grading in un risultato numerico (A=1; B=2; C=3; D=4; E=5). Nello specifico, esami con media finale <1,5 sono

### Tabella 1

*Sintesi delle raccomandazioni del Gruppo di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica di SIBioC-Medicina di Laboratorio (GdS VEA) in merito alla possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi*

Raccomandazione	Forza
Valutare localmente, utilizzando i dati della letteratura o le note inviate dai produttori dei test, la possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi in uso al laboratorio.	A
Informare i clinici sul tipo di immunodosaggi in uso al laboratorio che possono essere sensibili ad interferenza da biotina.	A
Informare i clinici sulla direzione dell' interferenza da biotina (positiva o negativa) degli immunodosaggi in uso al laboratorio.	B
Comunicare ai clinici di valutare sempre in anamnesi se i pazienti facciano uso di biotina come supplemento alimentare, soprattutto ad alto dosaggio (>5 mg/die).	A
Comunicare ai clinici che in presenza di risultati degli immunodosaggi non compatibili con la clinica è necessario ripetere accuratamente l'anamnesi, volta ad escludere l'assunzione di biotina da parte del paziente.	A
All'atto del prelievo, il prelevatore deve sempre interrogare il paziente sull'utilizzo di integratori alimentari a base di biotina.	B
In pazienti che utilizzino biotina ad alto dosaggio il prelievo deve essere eseguito ad almeno 24-48 ore dall'ultima somministrazione.	A
La segnalazione sull'uso di integratori alimentari a base di biotina deve sempre accompagnare il campione biologico in Laboratorio.	B
Quantificare la concentrazione di biotina in tutti i campioni in cui siano previsti test con possibile interferenza.	D
Aggiungere una nota in refertazione ad esami potenzialmente influenzati da biotina, specificando "POSSIBILE INTERFERENZA PER ALTE DOSI DI BIOTINA".	B

stati classificati come grado "A", media compresa tra 1,5 e <2,5 come grado "B", media compresa tra 2,5 e <3,5 come grado "C", e media compresa tra 3,5 e <4,5 come grado "D" e media  $\geq 4,5$  come grado "E". La sintesi finale delle raccomandazioni del GdS VEA è descritta in Tabella 1.

In sintesi, le raccomandazioni di consenso scaturite sono le seguenti:

#### Grado A:

- valutare localmente la possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi in uso al laboratorio;
- informare i clinici sugli immunodosaggi del laboratorio sensibili ad interferenza da biotina;
- comunicare ai clinici di valutare sempre in anamnesi se i pazienti facciano uso di biotina come supplemento alimentare, soprattutto ad alto dosaggio;
- comunicare ai clinici che in presenza di risultati degli immunodosaggi non compatibili con la clinica è necessario escludere l'assunzione di biotina da parte del paziente;
- rieseguire il prelievo ad almeno 24-48 ore dall'ultima somministrazione in pazienti che utilizzino biotina ad alto dosaggio.

#### Grado B:

- informare i clinici sulla direzione dell'interferenza da biotina;
- il prelevatore deve sempre interrogare il paziente sull'utilizzo di integratori alimentari a base di biotina;
- la segnalazione sull'uso di integratori alimentari a base di biotina deve sempre accompagnare il campione biologico in Laboratorio;
- il laboratorio può valutare se aggiungere una nota in refertazione ad esami potenzialmente influenzati da biotina, specificando "POSSIBILE INTERFERENZA PER ALTE DOSI DI BIOTINA".

Secondo le raccomandazioni di consenso scaturite, il GdS non ritiene invece ragionevole quantificare la concentrazione di biotina in tutti i campioni in cui siano previsti test con possibile interferenza.

È auspicio di tutti i componenti del GdS VEA che le suddette raccomandazioni di consenso possano rappresentare una utile base al fine di sviluppare analoghe misure per minimizzare i possibili effetti sui pazienti dell'interferenza da biotina sui test immunochimici di laboratorio.

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i membri del GdS SIBioC-VEA che hanno contribuito a formulare le raccomandazioni: Adriano Anesi, Giuseppe Banfi, Anna Rosa Corno, Maria Luisa De Angelis, Anna Ferrari, Maria Loredana Frassanito, Giovanni Lombardi, Barbara Marcon, Valentino Miconi, Bruno Milanesi, Martina Montagnana, Benedetto Morelli, Rocco Negri, Elisa Piva, Brunetta Porcelli, Laura Roli, Ernesto Traubio, Roberto Vettori.

#### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Fiume MZ; Cosmetic ingredient review Expert Panel. Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol* 2001;20 Suppl 4:1-12.
2. Zempleni J, Mock DM. Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutr Biochem* 1999;10:128-38.
3. Colon PJ, Greene DN. Biotin interference in clinical immunoassays. *J Appl Lab Med* 2018;3:941-5.
4. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2008;3:715-24.
5. Zempleni J, Wijeratne SS, Hassan YI. Biotin. *Biofactors* 2009;35:36-46.
6. Soleymani T, Lo Sicco K, Shapiro J. The infatuation with biotin supplementation: is there truth behind its rising popularity? A comparative analysis of clinical efficacy versus social popularity. *J Drugs Dermatol* 2017;16:496-500.
7. Evans E, Piccio L, Cross AH. Use of vitamins and dietary supplements by patients with multiple sclerosis: A Review. *JAMA Neurol* 2018;75:1013-21.
8. Kummer S, Hermsen D, Distelmaier F. Biotin treatment mimicking Graves' disease. *N Engl J Med* 2016;375:704-6.
9. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:9343-53.
10. Chun KY. Biotin interference in diagnostic tests. *Clin Chem* 2017;63:619-20.
11. Li J, Wagar EA, Meng QH. Comprehensive assessment of biotin interference in immunoassays. *Clin Chim Acta* 2018;487:293-8.
12. Li D, Radulescu A, Shrestha RT, et al. Association of biotin ingestion with performance of hormone and nonhormone assays in healthy adults. *JAMA* 2017;318:1150-60.
13. Food and Drug Administration. FDA warns that biotin may affect some lab test results. <https://labtestsonline.org/news/fda-warns-biotin-may-affect-some-lab-test-results> (ultimo accesso: ottobre 2018).
14. Istituto Superiore di Sanità. Manuale metodologico – Come produrre, diffondere e aggiornare raccomandazioni per la pratica clinica. [http://old.iss.it/binary/lgmr2/cont/Manuale\\_PNLG.1234439852.pdf](http://old.iss.it/binary/lgmr2/cont/Manuale_PNLG.1234439852.pdf). (ultimo accesso ottobre 2018).

## Raccomandazioni per l'implementazione del Test genetico *BRCA1/2* nelle pazienti con carcinoma ovarico: dall'analisi sul tessuto tumorale a quella su DNA germinale.

A cura di: Gruppo di Lavoro SIBioC Biologia Molecolare, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica-Divisione Italiana della International Academy of Pathology (SIAPEC-IAP). Revisione Ottobre 2018.

Massimo Barberis, Maria Angela Bella, Fiamma Buttitta, Ettore Capoluongo<sup>1</sup>, Paola Carrera, Nicoletta Colombo, Laura Cortesi, Maurizio Genuardi, Massimo Gion, Stefania Gori, Valentina Guarneri, Nicla La Verde, Domenica Lorusso, Antonio Marchetti, Paolo Marchetti, Nicola Normanno, Barbara Pasini, Matilde Pensabene, Sandro Pignata, Paolo Radice, Enrico Ricevuto, Antonio Russo, Anna Sapino, Pierosandro Tagliaferri, Pierfrancesco Tassone, Chiara Trevisiol, Mauro Truini, Liliana Varesco

<sup>1</sup>Coordinatore del Gruppo di Studio SIBioC Biologia Molecolare

### ABSTRACT

**Recommendations for the implementation of *BRCA1/2* testing in ovarian cancer patients: from tumor to germline analysis. Joint document from SIBioC, AIOM, SIGU, SIAPEC-IAP.** Since the approval of the first poly adenosine diphosphate (ADP) ribose polymerase inhibitor (PARPi), olaparib for platinum-sensitive relapsed high grade ovarian cancer, with either germline or somatic *BRCA1/2* deleterious variants, the strategies for *BRCA1/2* testing are dynamically changing. In fact, along with germline assay, patients are now tested for tumor *BRCA1/2* also above all for treatment decisions. In fact, it is reported as by tumor BRCA analysis we can identify 3–9% more mutated women which can therefore benefit from PARPi therapy. Although this new type of approach looks like challenging, in particular due to the technical and analytical difficulties regarding low quality DNA deriving from formalin-fixed paraffin-embedded specimens, the new CE-IVD on NGS-based pipelines, can overcome these issues, allowing specialized molecular laboratories to ensure high quality results and perform the best test settings. Nevertheless, each new NGS pipeline (CE-IVD or in house) should be validated using peculiar samples along with commercially available reference and certified materials, before being introduced in routine settings. The validation set should be appropriately chosen in order to provide unequivocal data regarding robustness of each NGS *tBRCA* pipeline. Therefore, in order to harmonize the patient and laboratory path, a group of Italian Scientific Societies [Italian Society of Clinical Chemistry (SIBioC), Italian Association of Medical Oncology (AIOM), Italian Association of Clinical Pathology (SIAPEC), Italian Society of Human Genetics (SIGU)] provided the present recommendations which are aimed to guide all professionals (oncologists, gynaecologists, clinical and laboratory geneticists, clinical molecular biologists and pathologists). The intersociety group is confident that the present paper can offer all ovarian cancer women a well-organized pathway of diagnosis and treatment.

### INTRODUZIONE

Le Raccomandazioni 2018 AIOM, SIGU, SIBIOC e SIAPEC-IAP rappresentano un aggiornamento di un precedente documento del 2015 e sono relative

all'implementazione dell'indagine Breast Cancer Related Antigens (BRCA) nelle pazienti con carcinoma ovarico, con una doppia possibile applicazione (Figura 1) (1):

Corrispondenza a: Ettore Capoluongo, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS, Università Cattolica, Roma.  
E-mail [ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it](mailto:ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it)

Ricevuto: 12.02.2019

Accettato: 07.03.2019

Pubblicato on-line: 29.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.026

- l'identificazione delle pazienti con maggiore possibilità di risposta a specifiche terapie antitumorali;
- la diagnosi di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori allo scopo di individuare, mediante test preventivo per la ricerca della variante patogenetica familiare, i parenti a rischio aumentato di neoplasia da indirizzare a programmi finalizzati alla prevenzione (primaria e/o secondaria).

Le principali modifiche apportate in questa versione aggiornata riguardano:

- la disponibilità attuale di alcuni nuovi inibitori dell'enzima poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) indipendentemente dalla presenza di una variante patogenetica BRCA
- la disponibilità e validazione del test somatico per l'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2*

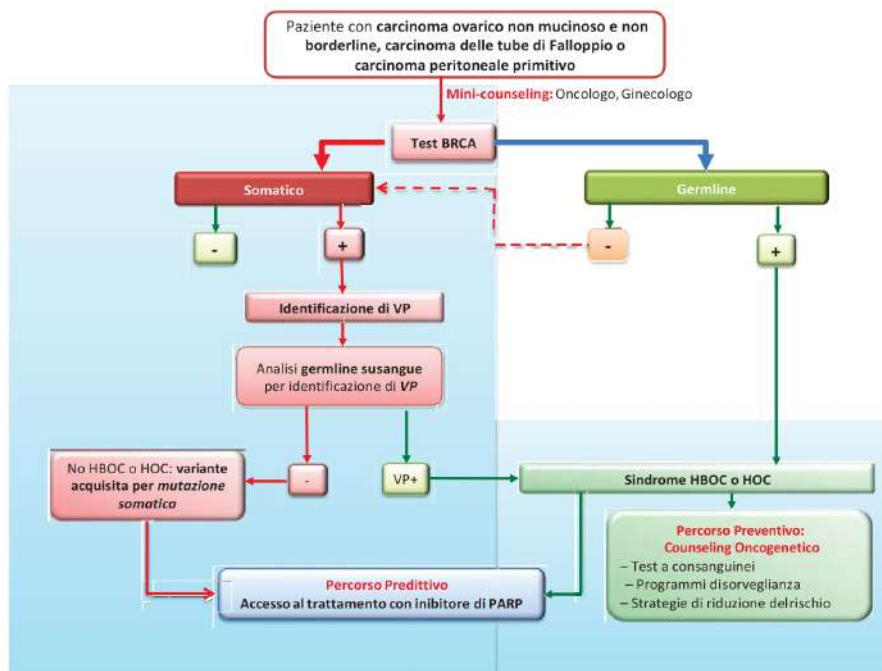
### TEST BRCA COME TEST PREDITTIVO DI EFFICACIA ALLE TERAPIE ANTITUMORALI

Studi retrospettivi hanno evidenziato che le pazienti affette da carcinoma ovarico, portatrici di una variante patogenetica costituzionale (germinale) BRCA, presentano una maggiore sensibilità farmacologica a combinazioni terapeutiche contenenti derivati del platino (2-4), anche quando somministrato ad alte dosi, come si fa abitualmente nella chemioterapia intraperitoneale, nonché sensibilità a doxorubicina liposomiale peghilata e trabectedina (5, 6). Inoltre, è stato dimostrato che le varianti patogenetiche dei geni BRCA, siano esse di natura germinale o somatica,

rappresentano un biomarcatore predittivo di maggiore sensibilità al trattamento con inibitori dell'enzima Poli (ADP-ribosio) Polimerasi (PARP), che interviene nella riparazione del DNA danneggiato a singolo filamento, nelle pazienti affette da carcinoma dell'ovaio in fase avanzata. L'efficacia dei PARP inibitori come opzione terapeutica nel carcinoma dell'ovaio si realizza attraverso un meccanismo di "letalità sintetica" in presenza di una concomitante perdita di funzione dei meccanismi di riparazione del DNA a doppio filamento mediante ricombinazione omologa (HR), nei quali le proteine BRCA1/2 svolgono un ruolo essenziale (7-11). La perdita di funzione delle proteine BRCA1/2 quale effetto di alterazioni costituzionali o somatiche dei geni corrispondenti rappresenta la condizione più frequente, anche se non esclusiva, di disfunzione dei meccanismi di HR (12, 13).

La prevalenza di varianti patogenetiche costituzionali BRCA in pazienti affette da carcinoma ovarico è >10%, indipendentemente dall'età alla diagnosi e dalla storia familiare (14). Circa il 25% delle portatrici di varianti patogenetiche BRCA, infatti, ha una diagnosi di carcinoma ovarico ad un'età superiore ai 60 anni. La prevalenza di varianti patogenetiche sale al 17-20% nelle pazienti con carcinoma ovarico sieroso (2, 9), al 23-25% se di alto grado (15) e al 30-40% se la malattia è platino-sensibile.

Studi clinici hanno portato nell'ottobre del 2014 alla registrazione da parte dell'Agenzia Regolatoria Europea [European Medicines Agency (EMA)] del PARP inibitore, olaparib, "come terapia di mantenimento nelle pazienti con recidiva platino-



**Figura 1**

Diagramma di flusso delle modalità di accesso al test BRCA delle pazienti affette da carcinoma ovarico.

HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; HOC, hereditary ovarian cancer; VP, variante patogenetica; PARP, poli(ADP-ribosio) polimerasi

sensibile di carcinoma ovarico epiteliale sieroso di alto grado, di carcinoma delle tube di Falloppio o di carcinoma primitivo del peritoneo BRCA mutato (con mutazione nella linea germinale o somatica), che sono in risposta completa o parziale alla chemioterapia a base di platino” (16, 17). In Italia l'agenzia per farmaco (AIFA) ha autorizzato il farmaco con la stessa indicazione, specificando che “il trattamento con olaparib deve essere avviato e supervisionato da un medico specializzato nell'impiego dei farmaci antitumorali. Le pazienti devono avere conferma di una mutazione del gene di suscettibilità al carcinoma mammario (BRCA) (nella linea germinale o nel tumore) prima di iniziare il trattamento con olaparib. La valutazione dello stato di mutazione di BRCA deve essere effettuata in un laboratorio specializzato che utilizzi un metodo di analisi validato” (18).

Niraparib, un altro PARP inibitore, è attualmente disponibile in Italia come monoterapia per il trattamento di mantenimento di pazienti adulte con carcinoma ovarico epiteliale sieroso, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primario, di grado elevato, recidivato, sensibile al platino, che stiano rispondendo (risposta completa o parziale) alla chemioterapia a base di platino (19), indipendentemente dalla presenza di difetti BRCA.

Più recentemente EMA ha approvato l'impiego di:

- olaparib, indipendentemente dallo stato BRCA (sulla base di studi prospettici randomizzati che hanno dimostrato il beneficio di questi farmaci come terapia di mantenimento in tutta la popolazione di pazienti con recidiva platino-sensibile);
- di un altro inibitore di PARP, il rucaparib, come terapia di mantenimento delle pazienti platino-sensibili con variante patogenetica BRCA germinale e/o somatica, con carcinoma ovarico ad alto grado, carcinoma delle tube di Falloppio o primitivo peritoneale, trattate con due o più linee di chemioterapia con platino e che non possono tollerare ulteriore terapia con platino (20).

Nonostante queste nuove opzioni terapeutiche abbiano dimostrato la loro efficacia anche in pazienti che non presentano alterazioni dei geni BRCA (wild type), è comunque importante che questi siano analizzati in tutte le pazienti con carcinoma ovarico (ad esclusione dei tumori mucinosi e borderline) per i seguenti motivi:

- le pazienti che risultano positive all'indagine presentano un beneficio al trattamento con PARP inibitori superiore rispetto a quelle in cui non sono state riscontrate varianti patogenetiche (21);
- l'utilizzo di olaparib come mantenimento dopo una chemioterapia di prima linea nelle pazienti positive al test BRCA ha evidenziato, in uno studio randomizzato di fase III, un vantaggio statisticamente significativo nella *progression-free survival* (PFS); infatti la mediana è stata di 13,8 mesi nelle pazienti che ricevevano placebo e non è stata raggiunta a 3 anni nelle pazienti che hanno ricevuto olaparib (HR 0,30; 95% CI 0,23- 0,41;  $p < 0,001$ ). Diventerà quindi importante

conoscere lo stato BRCA al momento della diagnosi iniziale, in quanto questa nozione potrebbe informare il trattamento di prima linea più adeguato (22). Per le pazienti BRCA-positivo affette da tumore ovarico viene posta indicazione ad una sorveglianza attenta sull'insorgenza di secondi tumori (carcinoma mammario e altri tumori associati alle sindromi eredo-familiari associati alle mutazioni dei geni BRCA);

- nelle pazienti BRCA-positivo con malattia avanzata l'incapacità di riparare il danno al DNA indotto dalla chemioterapia conferisce una prognosi significativamente migliore rispetto a quella delle pazienti *wild type*;
- le rilevanti implicazioni sulla prevenzione oncologica nei familiari, soprattutto in caso di esito positivo del test BRCA (17, 23-25).

#### Raccomandazioni

- Sulla base di queste evidenze, si ribadisce di proporre il test BRCA sin dal momento della prima diagnosi di carcinoma epiteliale ovarico non mucinoso e non borderline, di carcinoma delle tube di Falloppio o di carcinoma peritoneale primitivo.
- La proposta di esecuzione del test BRCA al momento della diagnosi deve avvenire fornendo una adeguata informazione su tutti gli aspetti collegati ai possibili risultati del test e rispettando i tempi decisionali della paziente.

### TEST BRCA PER LA DIAGNOSI DI PREDISPOSIZIONE EREDITARIA

Come menzionato precedentemente, il riscontro di una positività al test BRCA nelle donne con carcinoma ovarico permette ai collaterali di queste ultime l'accesso alla consulenza genetica oncologica e al test preventivo, finalizzato a verificare la presenza o meno della variante patogenetica familiare. Nel caso di esito positivo, saranno avviati i programmi finalizzati ad una diagnosi precoce dei tumori associati alle sindromi a trasmissione eredo-familiare da difetti dei geni BRCA ed alla riduzione del rischio di carcinoma mammario/ovarico.

Negli Stati Uniti, dove il test BRCA è universale per tutte le pazienti affette da tumore ovarico già da qualche anno, gli epidemiologi hanno stimato che le strategie di riduzione del rischio (mediche o chirurgiche) attuate sulle parenti sane positive al test preventivo, potrebbero portare ad una riduzione dell'incidenza del carcinoma ovarico del 40% in 10 anni (26). Questo risultato, in un tumore che ancora oggi non riconosce metodiche di screening e di prevenzione semplici ed efficaci, è di straordinaria importanza.

#### Raccomandazioni

- Il test BRCA è consigliato a tutte le pazienti con carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primitivo.
- È importante offrire il test BRCA sin dalla diagnosi.
- L'identificazione di una variante patogenetica nei geni BRCA consente di pianificare nelle pazienti affette un percorso terapeutico adeguato.

- L'identificazione di variante patogenetica germinale nei geni *BRCA* in una paziente con carcinoma ovarico permette di intraprendere un percorso di consulenza oncogenetica nei familiari al fine di identificare i portatori ad alto rischio, cui proporre programmi mirati di diagnosi precoce dei tumori associati alle sindromi a trasmissione eredo-familiare *BRCA*-relate e strategie finalizzate alla riduzione del rischio.

- La presa in carico delle donne con tumore ovarico *BRCA*-relato deve prevedere un approccio bio-psicosociale, che tenga conto dell'impatto della diagnosi e dei trattamenti sulla sfera fisica e psico-emotiva di ciascuna donna affetta da tumore ovarico, così come delle implicazioni psicologiche della problematica eredo-familiare e del coinvolgimento dei familiari sani a rischio, nel percorso decisionale.

È preferibile effettuare in prima istanza la ricerca delle mutazioni di *BRCA1/2* su tessuto tumorale, in quanto il test *BRCA* su sangue periferico è in grado di evidenziare soltanto le varianti costituzionali/ereditarie. La natura della variante identificata (costituzionale o somatica) sarà contestualmente stabilita analizzando un tessuto normale (sangue, altro tessuto).

Nel caso di variante acquisita per mutazione somatica, la paziente avrà accesso ad eventuale trattamento con inibitore di PARP.

Nel caso di variante costituzionale, oltre alla possibilità di accedere ad eventuale trattamento con inibitore di PARP, la paziente potrà accedere, attraverso il counseling oncogenetico, al percorso preventivo (tramite l'avvio di programmi di sorveglianza clinico-strumentale o l'effettuazione di strategie di riduzione del rischio).

Nel caso in cui il laboratorio di riferimento effettui esclusivamente il test su sangue periferico, per le pazienti che hanno un test germinale/costituzionale negativo, è opportuno inviare il tessuto tumorale ad altro laboratorio per ricerca delle varianti *BRCA1/2* a livello somatico.

## TIPOLOGIE DI TEST *BRCA*

Attualmente, il test *BRCA* su sangue periferico (test costituzionale o germinale) per la ricerca di varianti patogenetiche costituzionali è eseguito in molti laboratori attraverso metodologie ampiamente validate, in particolare sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*-NGS) eventualmente seguito da sequenziamento Sanger per la validazione delle varianti.

L'analisi di sequenza della porzione codificante dei geni *BRCA1* e *BRCA2* (esoni e giunzioni esoni/introni) permette di individuare piccole variazioni della sequenza del DNA (singoli cambiamenti nucleotidici, inserzioni/delezioni da poche paia a qualche decina di basi) e consente di identificare circa il 90% delle varianti patogenetiche *BRCA*. A completamento, deve essere eseguita la ricerca di ampi riarrangiamenti genici (ad esempio delezioni di uno o più esoni o dell'intero gene), che rappresentano una frazione variabile da popolazione a popolazione delle varianti patogenetiche *BRCA* germinali, globalmente pari a circa il 10%. Le analisi mediante metodiche NGS permettono di predire con un certo grado di affidabilità eventuali ampi

riarrangiamenti in *BRCA1/2*, che vengono generalmente confermati mediante metodiche quali la *Multiplex Ligation Probe dependent Amplification* (MLPA) o la *Multiplex Amplicon Quantification* (MAQ). Generalmente, MLPA e MAQ andrebbero utilizzate in modalità complementare, per escludere ad esempio dei falsi positivi originati sia dalla tecnologia NGS che da eventuali problematiche relative al sistema MAQ (27, 28).

In base ai dati ad oggi disponibili, è atteso che i 2/3 delle varianti patogenetiche *BRCA* identificabili in pazienti affette da carcinoma ovarico siano di tipo costituzionale (presente in ogni cellula dell'organismo), ereditate dalla madre o dal padre o comparse per effetto di mutazioni *de novo* (meno dell'1% dei casi) e trasmissibili ai figli (50% di probabilità per ogni figlio/a). In 1/3 dei casi le varianti patogenetiche sono invece esclusivamente somatiche e, pertanto, confinate al tessuto tumorale (8, 9).

Il test *BRCA* eseguito su tessuto tumorale (test somatico) è in grado di evidenziare sia le varianti acquisite per mutazione somatica sia quelle costituzionali. Pertanto, in caso di risultato positivo, l'alterazione va ricercata sul sangue periferico per verificare se si tratta di una variante costituzionale. L'analisi somatica consente di identificare una frazione di pazienti affette da carcinoma ovarico con variante patogenetica *BRCA* pari a circa il 7%, che rimarrebbero misconosciute con la sola indagine su sangue periferico (29). Tuttavia, per quanto esistano numerosi sistemi commerciali certificati CE per l'analisi in vitro (CE-IVD)-per l'analisi *BRCA1/2* su tessuto tumorale, ad oggi sono pochi i sistemi commerciali CE-IVD accoppiati a software bioinformatici dedicati alla esecuzione ed all'interpretazione dell'analisi *BRCA* sui tessuti tumorali. Tali sistemi non sono completamente affidabili per la valutazione degli ampi riarrangiamenti, mentre hanno affidabilità sovrapponibile a quella dell'analisi su sangue per le varianti puntiformi (29, 30).

Per l'esecuzione del test somatico vanno considerati i punti sotto riportati.

- Il campione chirurgico da sottoporre ad analisi molecolare deve essere ritenuto idoneo ( $\geq 20\%$  di cellule neoplastiche nel campione) (30) dall'anatomo-patologo, il quale deve valutare le caratteristiche del tessuto in esame ai fini di una eventuale macrodissezione manuale e, se necessario, selezionare le aree del campione più ricche di cellule tumorali.
- Le metodiche NGS permettono di individuare anche su tessuto, senza particolari difficoltà (29), le varianti tipicamente ritrovabili a livello germinale, ma possono fallire nell'identificare riarrangiamenti di media o grande dimensione e varianti alleliche a bassa frequenza nel campione in analisi.
- Infine, attualmente, in Italia sono ancora relativamente pochi i laboratori in cui si effettua l'esame su tessuto tumorale, mentre sono più numerosi i laboratori nei quali viene effettuata l'analisi su sangue periferico.

Per un'adeguata esecuzione del test BRCA, è necessario che i laboratori abbiano una comprovata esperienza di validazione del test e che partecipino a programmi di controllo di qualità esterni riconosciuti.

Esistono, comunque, specifiche raccomandazioni di tipo metodologico per la messa a punto di un flusso di lavoro di analisi NGS su tessuto tumorale ovarico per la ricerca delle varianti BRCA (29-30). Inoltre, l'impiego di standard ad hoc per ogni tipologia di processo analitico è fondamentale anche ai fini di una corretta analisi bioinformatica (31). Non ultimo, si ricorda la necessità di un'adeguata conservazione del tessuto secondo procedure pre-analitiche che consentano la migliore preservazione del DNA (30-32).

Il panel ritiene che si possano utilizzare oggi entrambi i test BRCA, su tessuto tumorale oppure su sangue, ma che sia preferibile, laddove possibile, eseguire in prima istanza il test somatico, considerando in ogni caso che il test, indipendentemente dal tipo di campione utilizzato - sangue o tessuto - richiede standard qualitativi da rispettare ed esperienza di analisi ed interpretazione.

Qualora si inizi il percorso con il test su sangue periferico, in caso di esito non informativo (nessuna variante patogenetica individuata) in una paziente che ha indicazione al trattamento con un PARP inibitore autorizzato solo quando sia documentata la presenza di una variante patogenetica in uno dei due geni BRCA, è opportuno inviare il tessuto tumorale ad un laboratorio qualificato per la ricerca delle varianti a livello somatico.

#### Raccomandazioni

- Il test BRCA su pazienti con carcinoma ovarico può essere effettuato su sangue periferico oppure su tessuto tumorale.

Tuttavia, è preferibile effettuare in prima istanza il test su tessuto tumorale, al fine di poter identificare varianti di natura sia germinale che somatica.

- Per il test somatico, i preparati istologici devono essere rivisitati da un patologo che individuerà le aree più rappresentative della lesione e con maggiore quantità di cellule tumorali.

- Il test su tessuto presenta tutt'ora delle problematiche tecniche che lo limitano a selezionati laboratori specializzati. I laboratori devono offrire un test validato e i risultati devono essere disponibili in tempi rapidi.

- Alle pazienti che hanno in prima istanza effettuato il test germinale con esito non informativo (nessuna variante patogenetica identificata) e che sono candidate ad un trattamento con PARP inibitori, va proposto il test somatico.

#### INTERPRETAZIONE DELLE VARIANTI GENETICHE BRCA

Lo spettro di variabilità allelica dei geni *BRCA1* e *BRCA2* è molto ampio. Pertanto, il problema della classificazione delle varianti genetiche identificate è di grande rilevanza, anche perché può accadere che il laboratorio individui una variante che non è stata segnalata in precedenza nella letteratura scientifica. Pur esistendo numerose modalità di classificazione delle varianti costituzionali BRCA (33), è opportuno adottare i criteri sviluppati dall'*Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles* (ENIGMA),

disponibili sul sito web del consorzio (34), in quanto più specifici e frutto di un'ampia collaborazione di esperti internazionali. ENIGMA classifica le varianti in cinque categorie, secondo le indicazioni dell'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) (35): benigna, probabilmente benigna, incerta, probabilmente patogenetica e patogenetica.

È importante sottolineare che i criteri sopra menzionati sono stati sviluppati al fine di definire il significato delle varianti nei geni *BRCA* come predittivi di rischio ereditario. Al momento, le informazioni relative all'effetto delle diverse varianti BRCA sulla risposta alle terapie sono più limitate e criteri specifici per la loro classificazione a questo scopo non sono ancora stati elaborati.

È necessario pertanto che i laboratori rendano evidenti le modalità di interpretazione delle varianti BRCA, indicando nel referto il significato clinico della variante genetica identificata ed elencando le informazioni essenziali utilizzate per la classificazione (36). In quest'ambito è opportuno che i laboratori partecipino a programmi esterni di controlli di qualità ed alle reti collaborative, nazionali ed internazionali, finalizzate alla raccolta sistematica e centralizzata delle varianti BRCA osservate, allo scopo di contribuire alla miglior classificazione delle stesse (37), per quanto concerne sia la definizione del rischio ereditario che la predizione della risposta alle terapie anti-tumorali.

È inoltre auspicabile effettuare una verifica periodica della classificazione delle varianti. Ogni riclassificazione deve essere comunicata al clinico di riferimento, in modo da trasferire l'informazione alla persona che si era sottoposta all'indagine.

#### Raccomandazioni

- Nel referto deve essere indicato il significato clinico della variante genetica BRCA identificata e devono essere elencate le informazioni essenziali utilizzate per la classificazione. Recentemente, sono stati sviluppati dal consorzio ENIGMA criteri specifici per l'interpretazione del significato clinico (accertamento di rischio ereditario) delle varianti costituzionali dei geni BRCA.

#### DISPONIBILITÀ DEL TEST BRCA E GESTIONE DEI RISULTATI NEL PERCORSO ASSISTENZIALE/TERAPEUTICO

I modelli di consulenza genetica oncologica tradizionali pre-test, sviluppati nei percorsi assistenziali di prevenzione, sono attualmente insufficienti a far fronte all'aumento dei volumi, particolarmente quando l'analisi genetica assume anche una valenza di predittività ai trattamenti che va determinata in tempi adeguati. Anche se il modello di consulenza genetica oncologica ottimale del percorso preventivo assicura una presa in carico completa degli aspetti genetici fin dalla fase pre-test, la necessità di ottenere in tempi adeguati il risultato dell'esame ai fini della programmazione terapeutica presuppone che siano anche gli oncologi ed i ginecologi con competenze oncologiche a richiedere direttamente il

test BRCA al laboratorio. In quest'ambito risulta indispensabile identificare modalità organizzative che assicurino la corretta interpretazione dei risultati a scopo clinico, la corretta gestione dei familiari che sono a rischio nel caso in cui si identifichi una variante patogenetica ereditaria, e la corretta valutazione genetica dei casi in cui il test BRCA sia risultato non informativo (36, 37).

Si sottolinea la necessità di definire percorsi aziendali in cui vengano indicate, in modo chiaro per le pazienti ed i loro familiari, le funzioni e le responsabilità dell'equipe oncologica, del laboratorio e dell'equipe di genetica clinica oncologica nelle varie fasi del percorso individuato. In assenza di standard riconosciuti, si evidenzia l'opportunità di sottoporre tali percorsi ad una verifica mediante audit programmati, in un'ottica di miglioramento della qualità delle prestazioni offerte. È auspicabile che tutte le regioni rendano gratuito il test BRCA per i familiari sani delle pazienti in cui è stata individuata una variante patogenetica BRCA1/2 e che venga offerto gratuitamente il programma di prevenzione proposto ai soggetti portatori di variante patogenetica eventualmente con l'introduzione di un codice di esenzione per malattie genetiche ereditarie.

#### Raccomandazioni

*-Si raccomanda di identificare modalità organizzative che assicurino la corretta interpretazione dei risultati del test a scopo clinico, la corretta gestione dei familiari a rischio nel caso in cui si identifichi una variante patogenetica ereditaria, e la corretta valutazione genetica dei casi in cui il test BRCA sia risultato non informativo.*

*- Appaiono necessari dei percorsi diagnostico-assistenziali (PDTA) in cui vengano indicate, in modo chiaro per le pazienti ed i loro familiari, le funzioni e le responsabilità dell'equipe oncologica, del laboratorio per l'esecuzione del test genetico somatico e germinale e dell'equipe di genetica clinica oncologica, nelle varie fasi del percorso individuato.*

#### ELEMENTI INDISPENSABILI DEL CONSENSO INFORMATO

Il test BRCA a fini prognostici e predittivi di risposta alle terapie può essere prescritto dal genetista, dall'oncologo e dal ginecologo con competenze oncologiche, che diventano responsabili anche di informare adeguatamente la paziente sugli aspetti genetici collegati ai risultati.

Le informazioni da dare alla paziente dovranno riguardare i potenziali benefici in termini prognostici e terapeutici, insieme alla possibilità di rilevare per se stessi la eventuale condizione di alto rischio di sviluppare un altro tumore e per i propri familiari di accedere ad analisi in grado di accertare la presenza di una predisposizione alla insorgenza di tumori. I tempi e le modalità di acquisizione del consenso all'esecuzione dell'indagine genetica dovranno essere rispettosi delle volontà della paziente, con disponibilità ad approfondire tutti i diversi aspetti prima della decisione, come ad esempio la scelta di comunicare o meno l'esito ad altri familiari.

Si richiede ai medici prescrittori del test BRCA di utilizzare un adeguato protocollo di comunicazione e raccolta del consenso scritto, attraverso la definizione di appositi moduli informativi e di consenso informato. È necessario che gli oncologi ed i ginecologi con competenze oncologiche che non abbiano una specifica esperienza in genetica oncologica intraprendano un percorso formativo che includa anche gli aspetti etici del test BRCA. Inoltre, nell'ambito di un percorso assistenziale andrà individuata un'équipe di genetica clinica oncologica cui fare riferimento qualora siano indicati, o richiesti dalla paziente, approfondimenti sugli aspetti genetici, prima della decisione di sottoporsi o meno al test e per i casi che presentano particolari problematiche.

#### Raccomandazioni

*- Si richiede ai medici prescrittori del test BRCA di utilizzare un adeguato protocollo di comunicazione e raccolta del consenso scritto, attraverso la definizione di appositi moduli informativi e di consenso informato.*

*- Le informazioni da dare alla paziente dovranno riguardare i potenziali benefici in termini prognostici e terapeutici, la possibilità di rilevare per sé stessi il rischio di sviluppare un altro tumore e l'opportunità per i propri familiari di effettuare test predittivi di rischio oncologico.*

*- È necessario che gli oncologi ed i ginecologi oncologi che non abbiano una specifica esperienza in genetica oncologica intraprendano un percorso formativo che includa anche gli aspetti etici del test BRCA.*

*- Andrà individuata un'équipe di genetica clinica oncologica, cui fare riferimento qualora siano indicati o richiesti dalla paziente approfondimenti sugli aspetti genetici.*

#### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Pinto C, Bella MA, Capoluongo E, et al. Recommendations for the implementation of BRCA testing in the care and treatment pathways of ovarian cancer patients. *Future Oncol* 2016;12:2071-5.
2. Alsop K, Fereday S, Meldrum C, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2012;30:2654-63.
3. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer *J Am Med Assoc* 2012;307:382-90.
4. George A, Kristeleit R, Rafii S, et al. Clinical factors of response in patients with advanced ovarian cancer participating in early phase clinical trials. *Eur J Cancer* 2017;76:52-9.
5. Safra T1, Borgato L, Nicoletto MO, et al. BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Mol Cancer Ther* 2011;10:2000-7.
6. Monk BJ, Lorusso D, Italiano A, et al. Trabectedin as a chemotherapy option for patients with BRCA deficiency. *Cancer Treat Rev* 2016;50:175-82.

7. Drost R and Jonkers J, Opportunities and hurdles in the treatment of BRCA1-related breast cancer. *Oncogene* 2014;33:3753–63
8. George J, Alsop K, Etemadmoghadam D, et al. Non equivalent gene expression and copy number alterations in high-grade serous ovarian cancers with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Clin Cancer Res* 2013;19:3474-84.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474:609-15.
10. Wiggans AJ, Cass GK, Bryant A, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;5:CD007929.
11. Cortesi L, Toss A, Cucinotto I. PARP inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2018;18:877-93.
12. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2012;801–17.
13. Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, et al. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1396-406.
14. Soegaard M, Kjaer SK, Cox M et al. BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence and clinical characteristics of a population-based series of ovarian cancer cases from Denmark. *Clin Cancer Res* 2008;14;:3761–7.
15. Rust K, Spiliopoulou P, Tang CY, et al. Routine germline BRCA1 and BRCA2 testing in ovarian carcinoma patients: analysis of the Scottish real life experience. *BJOG* 2018;125:1451-8.
16. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomized phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:852-61. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003726/human\\_med\\_001831.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003726/human_med_001831.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) (ultimo accesso: settembre 2018).
17. Determina AIFA n.251/2015; G.U. n.72 del 27-3-2015. [http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?sessionId=453xTGif8mbo+V4yq5tdg.ntc-as5guri2b?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2015-0327&atto.codiceRedazionale=15A02247&elenco30giorni=false](http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?sessionId=453xTGif8mbo+V4yq5tdg.ntc-as5guri2b?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2015-0327&atto.codiceRedazionale=15A02247&elenco30giorni=false) (ultimo accesso: settembre 2018).
18. Determina AIFA n 1367/2018; GU n.219 del 20-9-2018. [http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2018-0920&atto.codiceRedazionale=18A05991&elenco30giorni=false](http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2018-0920&atto.codiceRedazionale=18A05991&elenco30giorni=false) (ultimo accesso: settembre 2018).
19. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rubraca> (ultimo accesso: settembre 2018).
20. Staropoli N, Ciliberto D, Del Giudice T, et al. The Era of PARP inhibitors in ovarian cancer: "Class Action" or not? A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;131:83-9.
21. Moore KN, Colombo N, Scambia G, et al. Maintenance olaparib following platinum-based chemotherapy in newly diagnosed patients (pts) with advanced ovarian cancer (OC) and a BRCA1/2 mutation (BRCAm): Phase III SOLO1 trial. *Annals of Oncology Volume 29, 2018 Supplement 8, Abstract Book of the 43rd ESMO Congress.* [https://academic.oup.com/annonc/article/29/suppl\\_8/mdy424.041/5141798?searchresult=1](https://academic.oup.com/annonc/article/29/suppl_8/mdy424.041/5141798?searchresult=1)
22. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016;375:2154-64.
23. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004249/human\\_med\\_002192.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004249/human_med_002192.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) (ultimo accesso: settembre 2018).
24. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al; SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:1274-84.
25. Bayraktar S, Arun B. BRCA mutation genetic testing implications in the United States. *Breast* 2017;31:224-32.
26. Scaglione GL, Concolino P, De Bonis M, et al. A Whole germline BRCA2 gene deletion: How to learn from copy number variation (CNV) in silico analysis. *Int J Mol Sci* 2018 doi: 10.3390/ijms19040961.
27. Concolino P, Rizza R, Mignone F, et al. A comprehensive BRCA1/2 NGS pipeline for an immediate copy number variation (CNV) detection in breast and ovarian cancer molecular diagnosis. *Clin Chim Acta* 2018;480:173-9.
28. Ellison G, Ahdesmäki M, Luke S, et al. An evaluation of the challenges to developing tumor BRCA1 and BRCA2 testing methodologies for clinical practice. *Hum Mutat* 2018;39:394-405.
29. Capoluongo E, Ellison G, López-Guerrero JA, et al. Guidance statement on BRCA1/2 tumor testing in ovarian cancer patients. *Semin Oncol* 2017;44:187-97.
30. Zhong Q, Wagner U , Kurt H , et al. Multi-laboratory proficiency testing of clinical cancer genomic profiling by next-generation sequencing. *Pathol Res Pract* 2018;214:957-63.
31. Linee guida tracciabilità, raccolta, trasporto, conservazione e archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di anatomia patologica [www.salute.gov.it/imgs/C\\_17pubblicazioni\\_2369\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17pubblicazioni_2369_allegato.pdf) (ultimo accesso: settembre 2018).
32. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24. <https://enigmaconsortium.org/> (ultimo accesso: settembre 2018).
33. Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008;29:1282-91.
34. Claustres M, KožichV, Dequeker E, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic. *Eur J Hum Genet* 2014;22:160-70.
35. Wallis Y, Payne S, McAnulty C et al. Practice guidelines for the evaluation of pathogenicity and the reporting of sequence variants in clinical molecular genetics ACGS/VGKL. [www.acgs.uk.com/media/774853/evaluation\\_and\\_reporting\\_of\\_sequence\\_variants\\_bpgs\\_june\\_2013\\_-\\_finalpdf.pdf](http://www.acgs.uk.com/media/774853/evaluation_and_reporting_of_sequence_variants_bpgs_june_2013_-_finalpdf.pdf) (ultimo accesso: settembre 2018).

## Oncologia di precisione: la terminologia è importante.

A cura del Gruppo di Lavoro Biologia Molecolare di SIBioC, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica - (SIAPEC), Società Italiana di Farmacologia (SIF). Edizione Novembre 2018.

Antonio Russo<sup>1</sup>, Lorena Incorvaia<sup>1</sup>, Mauro Truini<sup>2</sup>, Antonio Marchetti<sup>2</sup>, Ettore Capoluongo<sup>3,5</sup>,  
Marcello Ciaccio<sup>3</sup>, Giuseppe Castaldo<sup>3</sup>, Romano Danesi<sup>4</sup>, Marzia Del Re<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM)

<sup>2</sup>Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica- (SIAPEC)

<sup>3</sup>Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

<sup>4</sup>Società Italiana di Farmacologia (SIF)

<sup>5</sup>Coordinatore del Gruppo di Studio Biologia Molecolare di SIBioC

### ABSTRACT

**Precision oncology: when the metrics does matter. Joint document from AIOM, SIBioC, SIAPEC, SIF.**

Precision oncology can be considered as the application of "Precision Medicine" to the management of cancer patients. Although this new chapter of the modern medicine is really exciting and many clinicians and researchers are spending some efforts in the setting of tests and clinical trials able to identify new potential biomarkers, the identification of the specific oncogenic mutation driving the tumor growth and giving a chance of target-selective drug, still remains challenging. Sometimes the term precision medicine as well as precision oncology can be considered too simplistic: in practice, indeed, some important issues like the genetic heterogeneity of tumors, the complexity of pathways used by different tumors, and the inevitable development of drug resistance, are not considered as a part of complete patients' disease evolution. Therefore, in order to guide clinicians and laboratory community to harmonize the metrics surrounding the precision oncology path, a glossary has been defined by an intersociety group. The present joint document has been elaborated by the following scientific societies: Italian Society of Clinical Chemistry (SIBioC), Italian Association of Medical Oncology, Italian Association of Clinical Pathology (SIAPEC), Italian Society of Pharmacology (SIF) and is aimed to allow the research and clinical communities to familiarize with new concepts and terminologies which are not often well defined. We underline as, in the management of the paths related to the precision oncology, the terminology is fundamental, both for the scientific aspects and for those related to the communication with the patients. Therefore, below is a glossary that can be useful to all specialists in the clinical area, basic and translational research.

### PREFAZIONE

L'oncologia sta attraversando un periodo di profondo cambiamento. Grazie alla ricerca di base e traslazionale è oggi noto che informazioni utili alla definizione di una terapia personalizzata sono da ricercare "all'interno" di ciascun tumore e ciò permette di individualizzare il trattamento più adeguato per il singolo paziente.

Inoltre, è stato dimostrato come il sistema immunitario sia in grado di controllare la proliferazione delle cellule neoplastiche e come questo fenomeno sia modulabile mediante l'uso di nuovi farmaci che permettono di ottenere sopravvivenze molto lunghe nel 20-30% dei pazienti trattati, con una buona qualità di vita.

Nonostante la ricchezza di innovazioni e gli sforzi profusi dalla comunità scientifica, tante sono le

Corrispondenza a: Ettore Capoluongo, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS, Università Cattolica, Roma.  
E-mail [ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it](mailto:ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it)

Ricevuto: 12.02.2019

Accettato: 07.03.2019

Pubblicato on-line: 29.04.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.027

problematiche rilevanti ancora oggi oggetto di dibattito: dal superamento della resistenza secondaria che comunque insorge dopo un certo lasso di tempo, al contenimento dei costi di questi farmaci che rischiano di minare la sostenibilità del nostro sistema sanitario nazionale, sistema universalistico che deve assicurare tutela e cura a tutti i cittadini.

L'obiettivo di questo glossario dedicato all'oncologia di precisione è quello di diffondere i principali aspetti legati alla personalizzazione delle cure e alla innovatività, che costituiscono i principi cardine della moderna oncologia.

Nella gestione dei percorsi relativi alla oncologia di precisione, la terminologia risulta fondamentale, sia per gli aspetti scientifici che per quelli di comunicazione con i pazienti. È proprio in quest'ottica che è stato costruito il glossario scientifico (suddiviso in "area di patologia, oncologia e farmacologia molecolare" e "area di metodologia e studi clinici") che potrà essere utile a tutti gli specialisti dell'area clinica, della ricerca di base e traslazionale.

## INTRODUZIONE

Una delle nuove sfide per il futuro in oncologia è quella di riuscire ad integrare l'innovazione tecnologica e la ricerca traslazionale, allo scopo di chiarire aspetti ancora misconosciuti della biologia e della genetica delle neoplasie che consentano un trattamento personalizzato sulla base delle caratteristiche molecolari del paziente e della sua malattia.

Il concetto di "oncologia di precisione" prevede che specifiche alterazioni di una sequenza genica (o parte di essa), RNA o proteina che presentino alterazioni molecolari, in un paziente con neoplasia, diventino il *target* di un trattamento individualizzato. Il razionale della "precisa" selezione del paziente sulla base delle caratteristiche molecolari della neoplasia di cui è affetto, è il potenziale beneficio clinico maggiore e per un tempo più lungo, rispetto al trattamento con la classica chemioterapia citotossica.

Si passa, così, dal classico approccio "*one size fits all*", che prevedeva la categorizzazione della neoplasia sulla base dell'organo da cui prende origine e del tipo istologico, ad una classificazione basata sul profilo molecolare.

La caratterizzazione delle alterazioni genetiche dei tumori, e la comprensione della complessa interazione tra le molecole dello stesso *network* rappresenta, pertanto, il fondamento su cui si basa l' oncologia di precisione (1,2).

Dopo il completamento della mappatura del genoma umano nell'ambito dello *Human Genome Project* avvenuto nel 2001, si sono sviluppate rapidamente non solo la genetica molecolare, ma anche la genomica e la proteomica, con la possibilità di studiare oltre alle alterazioni genetiche ed epigenetiche, anche le variazioni proteiche legate all'espressione genica e le vie di trasduzione del segnale che sottendono alla complessità dei processi

cellulari.

I progressi nel campo della genomica sono stati resi possibili dal recente sviluppo di nuove tecnologie, quali la *next generation sequencing* (NGS) altrimenti detta *massive parallel sequencing* (MPS), che consentono di effettuare il sequenziamento di più ampie porzioni geniche rispetto alle precedenti tecnologie, con tempi ridotti e un aumento della sensibilità analitica (3), con lo scopo di identificare le mutazioni *druggable*, cioè corrispondenti a specifici bersagli molecolari su cui scegliere i farmaci *targeted*.

Le potenzialità di queste piattaforme nella pratica clinica sono legate sia all'analisi di cellule su tessuto tumorale, che all'analisi del DNA tumorale circolante (*circulating tumor DNA*, ctDNA) contenuto nel DNA libero circolante (*cell free DNA*, cfDNA) che può essere isolato dal sangue periferico e dai fluidi biologici (profilazione molecolare degli acidi nucleici circolanti tumorali nei liquidi cavitari, sintetizzata con il termine surrogato di biopsia liquida). Il principale campo di applicazione della biopsia liquida (termine riduttivo attualmente riferito a quanto eseguito con un semplice prelievo di sangue) ad oggi è rappresentato dall'identificazione di fattori predittivi in pazienti con malattia avanzata ed è al momento utilizzata nella pratica clinica per l'analisi mutazionale del gene dell'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) in stadio avanzato (4).

In realtà, la biopsia liquida avrà una più ampia applicazione in futuro nell'ambito dell'oncologia di precisione, in quanto sono numerose le componenti molecolari o subcellulari oltre al ctDNA, quali per esempio gli esosomi, che possono rappresentare uno strumento importante per seguire nel tempo la dinamica evoluzione della neoplasia.

Lo sforzo della comunità scientifica è ora quello di trasferire le conoscenze genomiche e proteomiche della ricerca di base alla pratica clinica, per fornire informazioni clinicamente rilevanti per la scelta di un trattamento personalizzato, nell'ottica della medicina di precisione.

Infatti, l'avanzamento scientifico e tecnologico ha permesso di identificare un elevatissimo numero di potenziali biomarcatori che rappresentano il bersaglio contro il quale possono essere sviluppati specifici farmaci *targeted*. Tuttavia, nella complessa biologia tumorale, non è sufficiente identificare un'alterazione genetica per essere sicuri che questa possa rappresentare un fattore predittivo di risposta o resistenza terapeutica: la presenza di un'alterazione genetica e la disponibilità di un farmaco diretto contro di essa, sono solo dei presupposti (a volte surrogati) di efficacia. Esistono, infatti, varianti denominate *driver* e mutazioni *passenger*. Nonostante molte neoplasie dipendano da un singolo oncogene per la loro crescita e sopravvivenza (secondo la teoria di *oncogene addiction* o *oncogene driver*), la pressione selettiva esercitata dal trattamento farmacologico sul *network* di

segnali intracellulari può determinare l'iperattivazione di vie alternative e/o compensatorie che si traducono in una modulazione non ottimale del bersaglio dei farmaci.

Un altro punto critico che può rappresentare un ostacolo alla medicina di precisione è l'eterogeneità tumorale: il genoma tumorale evolve dinamicamente nel tempo e accumula alterazioni genetiche in differenti sub-cloni cellulari (5). Ciò si traduce in una eterogeneità intratumorale sia spaziale (ovvero tra il tumore primitivo e le sedi metastatiche o, addirittura, all'interno dello stesso nodulo tumorale), sia temporale (ovvero le caratteristiche bio-molecolari della neoplasia possono variare nel tempo). In quest'ottica la profilazione molecolare degli acidi nucleici circolanti tumorali (ctANs) potrebbe rappresentare uno strumento utile per ottenere un quadro dinamico dell'evoluzione molecolare della malattia, sebbene non esista ad oggi evidenza che indirizzi a modificare la scelta terapeutica. Infatti, sebbene il contenuto in ctNAs del sangue periferico sia in grado di rappresentare in maniera più esaustiva, rispetto al DNA estratto dalla biopsia tissutale, l'eterogeneità molecolare della malattia contenendo, potenzialmente, DNA tumorale derivante dalle diverse aree di uno stesso tumore, (in presenza di eterogeneità tumorale,) fornisce scarse informazioni sulla rappresentatività, nel contesto del tumore, del biomarcatore individuato o della cellularità da cui origina.

Infine, il nuovo approccio diagnostico-terapeutico alle neoplasie, che integra criteri clinico-patologici con le analisi molecolari, si riflette anche nella conduzione delle sperimentazioni cliniche: la medicina di precisione ha fatto sì che le sperimentazioni cliniche relative ai nuovi farmaci a bersaglio molecolare, siano diventate difficili da condurre attraverso i classici disegni degli studi clinici controllati: la classificazione basata sul profilo molecolare causa una segmentazione delle neoplasie in numerosi sottotipi molecolari, nei quali rientrano sottogruppi di pazienti poco numerosi. Sono stati, pertanto, sviluppati nuovi disegni di studi clinici, come i *Basket trial* e *Umbrella trials*, nei quali i pazienti vengono reclutati sulla base delle caratteristiche genetiche e molecolari della neoplasia, con lo scopo di somministrare un trattamento solo ai pazienti potenzialmente più responsivi, riducendo l'utilizzo di farmaci inefficaci e comunque tossici, nonché i tempi di sviluppo dei nuovi farmaci e i costi associati (6).

Nasce, pertanto, l'esigenza di creare gruppi di lavoro multidisciplinari, che possano garantire l'integrazione e il confronto tra diverse figure professionali, quali oncologo, biologo molecolare, genetista, anatomo-patologo e farmacologo i quali, fornendo ognuno le loro competenze, permettono una corretta interpretazione dei dati genetici e molecolari e la scelta della più adeguata strategia terapeutica. L'istituzione di un *Molecular Tumor Board* è il primo passo per garantire al paziente tale multidisciplinarietà e l'accesso ad opzioni di trattamento personalizzate.

Per far sì che i numerosi progressi scientifici e

tecnologici trovino applicazione in ambito clinico è necessario, infine, che le risorse economiche impiegate riescano a supportare i costi elevati legati all'utilizzo dei nuovi farmaci e delle metodiche analitiche sempre più sofisticate (13). Tutto ciò per consentire una piena attuazione delle risorse disponibili e per poter proseguire nell'ambizioso progetto di una oncologia di precisione.

Nella gestione dei percorsi relativi all'oncologia di precisione, la terminologia risulta fondamentale, sia per gli aspetti scientifici che per quelli di comunicazione con i pazienti. Pertanto, si riporta di seguito un glossario che potrà essere utile a tutti gli specialisti dell'area clinica, della ricerca di base e traslazionale.

## AREA DI PATOLOGIA, ONCOLOGIA E FARMACOLOGIA MOLECOLARE

### Alterazione del numero di copie (somatico)

Definisce un cambiamento nel numero di copie che insorge nelle cellule somatiche, incluse quelle tumorali. Comprende guadagni e perdite di segmenti cromosomici o di cromosomi/bracci cromosomici completi oltre ad amplificazioni e delezioni focali.

### Alterazione genomica *actionable*

Include alterazioni *targetable* e alterazioni genomiche che non costituiscono un bersaglio diretto ma che portano comunque ad una disregolazione di un *pathway* nel quale vi possono essere altri possibili bersagli (ad esempio alterazioni dell'oncosoppressore *PTEN* possono essere aggredite tramite l'utilizzo di inibitori di PI3K/AKT).

### Alterazioni *targetable*

Alterazione genomica che porta alla produzione di una proteina modificata per la quale è disponibile o può essere sviluppato uno specifico farmaco. In questo caso si parla quindi di terapia *target* il cui razionale è spiegato dalla teoria dell'*oncogene addiction*, come nel caso delle kinasi).

### Amplificazione genica

Aumento del numero di copie di una regione ristretta di un cromosoma, con possibile conseguente aumento dell'mRNA e quindi delle proteine prodotte da quel gene. I meccanismi che generano amplificazione includono ricombinazione, cicli di rottura-fusione-ponte, stallo della forca di replicazione e cambio dello stampo.

### Biopsia liquida

Prelievo di fluidi biologici (sangue, urine, liquido cefalo-rachidiano, saliva) nei quali è possibile isolare componenti del tumore (DNA, RNA, miRNA, proteine, esosomi, cellule tumorali) che forniscono informazioni sulle caratteristiche molecolari/immunologiche della

neoplasia (4).

### Cellule tumorali circolanti

Cellule che si distaccano dalla massa tumorale e che si riversano nei fluidi biologici quali sangue e liquido cefalo-rachidiano. Possono essere valutate sotto il profilo della loro numerosità, isolate e utilizzate per ottenere informazioni circa le caratteristiche molecolari del tumore. È inoltre possibile isolarle singolarmente e caratterizzarle attraverso NGS.

### Clone tumorale

Cellule tumorali originatesi da una stessa cellula ancestrale e che presentano le stesse mutazioni somatiche presenti a livello dell'antenato più recente.

### Colture organotipiche

Colture tissutali da cui derivano campioni tumorali che sono trattati in modo tale da preservarne l'architettura tissutale e l'eterogeneità intratumorale, e sono coltivati in genere per brevi periodi di tempo.

### Colture primarie

Colture cellulari ottenute da campioni tumorali che sono coltivati in vitro mediante pochi passaggi.

### DNA tumorale circolante

Porzione del DNA libero circolante rilasciato direttamente dal tumore a livello di diversi fluidi biologici (sangue, urine, liquidi di effusione, liquido cefalo-rachidiano, saliva) e che può essere utilizzato per ottenere informazioni circa le caratteristiche molecolari del tumore.

### Exposoma

Si riferisce all'insieme di effetti che l'ambiente esercita sul nostro organismo sia a livello genomico che di espressione genica, e che quindi ricadono nel grande campo delle modificazioni epigenetiche nel più ampio significato che ormai questa parte importante della biologia molecolare e della medicina ha assunto.

### Eterogeneità inter- tumorale

Differenze trascrizionali, genomiche, epigenomiche, patologiche e cliniche tra tumori di soggetti diversi (5,7).

### Eterogeneità intra- tumorale

Coesistenza, all'interno di uno stesso tumore, di molteplici subcloni che presentano diverse caratteristiche trascrizionali, morfologiche, genomiche ed epigenomiche. Si può inoltre distinguere una "eterogeneità temporale" per cui la struttura subclonale varia nel tempo anche in relazione all'esposizione al trattamento e una "eterogeneità spaziale" per cui i subcloni tumorali mostrano delle differenze all'interno dello stesso tumore primitivo o tra tumore primitivo e siti metastatici (5,7).

### Evoluzione clonale

Il meccanismo che porta allo sviluppo di un tumore a partire da una cellula normale attraverso l'accumulo continuo di mutazioni, selezione clonale ed espansione clonale.

### Farmaco *target-specifico*

La caratteristica di interazione selettiva tra farmaco e bersaglio definisce questa categoria di medicinali che si distingue nettamente dai citotossici classici. I farmaci *target* si caratterizzano per selettività, affinità e spettro di azione e sulla base di queste caratteristiche si possono differenziare in generazioni [ad esempio anti-EGFR di prima (gefitinib, erlotinib), seconda (afatinib, dacomitinib) e terza generazione (osimertinib)]. Queste differenze si traducono in attività clinica, interazioni farmacologiche e profilo di sicurezza peculiari.

### Modelli animali ortotopici

Modelli animali da cui derivano campioni tumorali che sono impiantati in topi immunodeficienti (o altre specie animali) nello stesso sito anatomico da cui è stato estratto il tumore nel paziente.

### Modelli animali umanizzati

Modelli animali da cui derivano campioni tumorali che sono impiantati in topi immunodeficienti (o in altre specie animali) in cui sono stati ricostituiti gli elementi essenziali del sistema immunitario umano.

### Modelli xenograft pazienti-derivati

Modelli animali da cui derivano campioni tumorali che sono impiantati in topi immunodeficienti (o in altre specie animali).

### Mutazioni *driver*

Le mutazioni *driver* si verificano nella regione codificante o regolatoria di geni associati allo sviluppo neoplastico (*driver genes*) che, alterando la funzione o l'attività di tali geni, hanno un ruolo fondamentale nelle fasi di iniziazione e di mantenimento della crescita fino alla progressione. Un tumore può avere diverse mutazioni *driver* e recenti evidenze mostrano che in media un tumore presenta quattro mutazioni *driver* (8).

### Mutazioni *passenger*

Le mutazioni *passenger* cadono sia a livello di regioni codificanti e non codificanti ma non conferiscono alle cellule tumorali nessun vantaggio in termini di crescita e sopravvivenza. Migliaia di mutazioni *passenger* vengono identificate nella maggior parte dei tumori e possono aiutarci nella comprensione della loro eziologia ed evoluzione. Lo studio di tali mutazioni su più ampie casistiche di tumori potrebbe però portare in futuro alla loro riclassificazione come mutazioni *driver*. Le mutazioni *passenger* possono anche essere rilevate a livello delle

cellule sane a seguito dell'esposizione a processi mutazionali intrinseci ed estrinseci.

### Mutazione/alterazione genomica

Alterazione stabile della sequenza del DNA che può essere germinale (ereditabile) o somatica (acquisita da una cellula dell'organismo durante la vita). A differenza delle varianti germinali che possono essere trasferite alla discendenza (figli), le mutazioni somatiche sono trasmesse solo alle cellule figlie che si originano per mitosi. Esistono diverse tipologie di alterazioni geniche che comprendono mutazioni puntiformi, varianti strutturali e modifiche nel numero di copie.

### Oncogene addiction

I tumori sono caratterizzati dalla presenza di diverse alterazioni geniche; molte di esse non hanno alcun effetto sulle funzioni cellulari ma alcune sono fondamentali per la sopravvivenza cellulare e guidano il processo di tumorigenesi (ad esempio la traslocazione cromosomica 9-22 con formazione del gene di fusione *BCR-ABL* nella leucemia mieloide cronica). La teoria della *oncogene addiction* postula quindi che la crescita e la sopravvivenza di alcuni tumori sia strettamente dipendente da un singolo oncogene alterato, pertanto la selettiva inibizione di questo specifico oncogene influisce negativamente sulla crescita/progressione tumorale (9,10).

### Oncogeni

Gli oncogeni sono geni capaci di indurre la trasformazione tumorale di una cellula normale; gli oncogeni sono presenti normalmente in tutte le cellule in forma non patogena (proto-oncogeni) e la loro attivazione è dovuta a un agente esterno, fisico o chimico, che provoca una mutazione del gene; molti virus tumorali contengono oncogeni (10).

### Oncosoppressori

Gli oncosoppressori sono geni che codificano per proteine che agiscono da freno per la divisione cellulare e subiscono un'inattivazione (riduzione dell'espressione genica o mutazioni inattivanti) durante il processo di cancerogenesi (10).

### Organoidi tumorali

Colture cellulari da cui derivano campioni tumorali che sono coltivati in vitro generando strutture molecolari tridimensionali che possono essere tramandate nel tempo e che mantengono alcune caratteristiche molecolari del tumore originario.

### Sub-clone tumorale

Progenie di cellule mutate che insorgono all'interno di un clone tumorale; nella massa tumorale solo una piccola parte delle cellule che la compone deriva dai sub-cloni

mentre la maggior parte si originano a partire dal clone ancestrale (5).

### Tumor board molecolare

Un gruppo multidisciplinare che include, oltre i diversi medici specialisti (oncologo, radiologo, anatomopatologo, radioterapista), anche altre figure professionali (patologo molecolare, genetista, biologo molecolare, bioinformatico, farmacologo), con l'obiettivo di fornire raccomandazioni cliniche sui singoli casi alla luce dell'esito delle moderne indagini di diagnostica molecolare.

### Variante benigna

Mutazione acquisita (somatica) o variante ereditaria (germinale) che non è associata al rischio di sviluppare una determinata patologia neoplastica.

### Variante deleteria

Il termine viene usato per definire un'alterazione genica responsabile dell'inattivazione o della compromissione dell'attività della corrispondente proteina cruciale nello sviluppo tumorale.

### Variante di tipo inserzione/delezione

Le inserzioni e delezioni (comunemente identificate come *indels*) sono determinate da aggiunta o perdita, rispettivamente, di uno o più nucleotidi. A seconda del numero di basi aggiunte o perse si parla di *indels* piccole (1-5 bp), medie (da 100 bp a 30 kb) e grandi (più di 30 kb). Inoltre, se il numero di nucleotidi inserito/perso non è divisibile per tre e l'alterazione cade all'interno di una regione codificante una proteina la mutazione può anche essere definita *frameshift* (scivolamento del codice di lettura). In caso contrario si parla invece di variante *in-frame* (senza scivolamento del codice di lettura).

### Variante in eterozigosi

La variante in eterozigosi è rappresentata dalla presenza di un allele alterato (su un cromosoma) e di un allele sano (sull'altro cromosoma); nel caso di una delezione in eterozigosi solo uno dei due alleli è delecto, mentre l'altro è perfettamente funzionante (nella condizione di *wild-type*).

### Variante in omozigosi

La variante in omozigosi si verifica quando entrambi gli alleli codificanti per una determinata proteina sono alterati. Ad esempio, una delezione in omozigosi è dovuta alla perdita bi-allelica di uno stesso segmento di DNA derivante da delezioni indipendenti che coinvolgono entrambi i cromosomi.

### Variante di significato clinico sconosciuto

Mutazione acquisita (somatica) o variante ereditaria (germinale) la cui associazione con il rischio di sviluppare

una determinata malattia è sconosciuto. In seguito ad evidenze scientifiche, tali varianti possono essere riclassificate come patogenetiche (deleterie) o benigne (prive di effetto).

### **Variante patogenetica**

Una mutazione acquisita (somatica) che conferisce un vantaggio in termini di sviluppo della neoplasia, o una variante ereditaria (germinale) che predispone un individuo ad una specifica patologia. La penetranza di tali varianti non è sempre completa, ovvero la presenza dell'alterazione non è sempre associata alla manifestazione della malattia nel corso della vita.

### **Variante puntiforme**

Variazioni focali del DNA dovute a sostituzioni singole o doppie di nucleotidi. Se la variante puntiforme interessa la regione codificante di un gene si possono distinguere:

- varianti sinonime: la sostituzione nucleotidica non determina alcun cambio amminoacidico a livello della proteina codificata (per effetto della ridondanza del codice genetico); se questa variante cade all'interno delle regioni di *splicing*, va prestata particolare attenzione alla verifica dei potenziali effetti sui meccanismi di *splicing*;
- variante missenso: in questo caso l'alterazione porta ad una sostituzione amminoacidica che potrà essere di natura conservativa (l'amminoacido inserito ha le stesse caratteristiche chimiche di quello originariamente presente) o non conservativa (l'amminoacido inserito ha caratteristiche chimiche diverse);
- variante non senso: la sostituzione porta all'introduzione di un codone di stop portando alla formazione di una proteina tronca verosimilmente non funzionante.

### **Varianti strutturali o riarrangiamenti genomici**

Comprendono tutte quelle alterazioni che determinano un cambiamento dell'orientamento, della posizione o del numero di copie di segmenti di DNA genomico. Solitamente si riferiscono a segmenti di DNA di 1 kbp o più grandi e includono inversioni, traslocazioni, delezioni e duplicazioni.

### **Variazione del numero di copie (germinale)**

Solitamente si riferisce a varianti germinali del numero di copie di un gene che contribuiscono alla variabilità genomica interindividuale e possono predisporre a diverse patologie ereditarie. La variazione del numero di copie di solito consiste in delezioni o numero variabile di copie di segmenti di DNA duplicati che possono contenere da due a tre nucleotidi o interi geni.

### **Vescicole extracellulari**

Piccole vescicole derivate dalle cellule tramite processi di esocitosi o di distacco della membrana cellulare e rilasciate in diversi fluidi biologici (sangue, urine, liquidi di effusione, liquido cefalo-rachidiano, saliva) che contengono e veicolano verso distretti lontani diverse componenti tumorali (acidi nucleici e proteine). Possono essere isolate e utilizzate per ottenere informazioni sulle caratteristiche molecolari del tumore.

## **AREA DI METODOLOGIA E STUDI CLINICI**

### **Alchemist trial**

Gruppo di trials disegnati con l'obiettivo di definire il ruolo degli agenti diretti contro *target* molecolari quali EGFR, ALK, ROS (TKI) o immunoterapici in pazienti affetti da NSCL in stadio precoce e radicalmente operati e sottoposti a trattamento adiuvante.

### **Avatar**

In campo oncologico, organismo che può essere utilizzato come modello vivente per ospitare cellule tumorali umane da trattare con agenti antineoplastici al fine di determinare la migliore scelta terapeutica in un'ottica di una medicina personalizzata.

### **Biomarcatore End-Point surrogato**

Uno o più parametri correlati al tumore o al paziente le cui modificazioni dinamiche in corso di trattamento riflettono in tempo reale l'attività antitumorale del trattamento stesso, in relazione ad un determinato outcome di riferimento (ricaduta/progressione di malattia o morte).

### **Biomarcatore predittivo**

Uno o più parametri correlati al tumore o al paziente che permettono di prevedere la risposta o resistenza del tumore ad un trattamento specifico.

### **Biomarcatore prognostico**

Uno o più parametri correlati al tumore o al paziente che permettono di stratificare i pazienti, al momento della diagnosi, in diverse classi di rischio in relazione a un determinato outcome di riferimento (ricaduta/progressione di malattia o morte), indipendentemente dal trattamento.

### **Circos plot**

È una rappresentazione grafica utilizzata per facilitare la visualizzazione dei dati di sequenziamento genomico e delle relative aberrazioni molecolari. Sono spesso usati per integrare una grande quantità di dati genomici per uno o più campioni per enfatizzarne particolarità, somiglianze o differenze. Le diverse

posizioni genomiche sono raffigurate come nastri. Ogni anello corrisponde ai dati molecolari di un paziente ordinati per le posizioni genomiche. Tipi diversi di aberrazioni molecolari possono essere rappresentati su diversi strati del cerchio.

### Forest plot

È una rappresentazione grafica globale dei risultati parziali ottenuti da una serie di studi scientifici che in genere affrontano lo stesso quesito, insieme alla rappresentazione del risultato finale stimato dall'analisi statistica combinata dei singoli studi inclusi. Il risultato di ciascuno studio è rappresentato da una linea orizzontale, mentre la linea perpendicolare che divide il grafico in due zone (trattamento *versus* controllo) corrisponde a "nessun effetto". L'elemento geometrico sovrapposto alla linea orizzontale indica la stima di effetto, per cui maggiore è il numero di pazienti nello studio e maggiore sarà la dimensione dell'elemento geometrico. La lunghezza della linea corrisponde all'intervallo di confidenza. Uno studio di pochi pazienti ha una linea più lunga e di conseguenza un risultato più incerto. Quando la linea dello studio tocca o attraversa la linea perpendicolare del "nessun effetto" il risultato, convenzionalmente, non è statisticamente significativo. Il risultato finale è rappresentato da un diamante posto ai piedi del grafico, la cui posizione rispetto alla linea verticale indicherà quale dei trattamenti valutati risulta più efficace.

### Genotype driven study

Questa tipologia di studi clinici prevede che i pazienti vengano arruolati in relazione alle caratteristiche molecolari della malattia definite mediante sequenziamento genico o altre metodiche di nuova generazione.

### Intelligenza artificiale nello sviluppo di un farmaco

Disciplina che si occupa di progettare macchine in grado di risolvere problemi in modo automatizzato. Oggi questa tecnologia ha raggiunto un livello estremamente avanzato sia nel calcolo computazionale sia nella capacità di analisi in real time (sviluppando hardware di piccoli dimensioni e poco costosi) in grado di analizzare una enorme mole di dati in tempi brevi e in qualsiasi forma. L'apprendimento di un grande bacino di dati ad una velocità non immaginabile per un essere umano in ambito sanitario permette di operare percorsi di diagnosi e di scelte terapeutiche ottimali.

### Iperprogressione

Un modello atipico di progressione al trattamento osservato in un piccolo sottogruppo di pazienti trattati con l'immunoterapia (8-12%). Si caratterizza per il riscontro di una progressione di malattia secondo criteri *Response-Evaluation-Criteria-In-Solid-Tumor* (RECIST) alla prima rivalutazione clinico-strumentale cui si associa

un incremento (più di 2 volte) del tasso di crescita tumorale valutato dall'inizio del trattamento immunoterapico al momento della rivalutazione (11).

### Machine Learning

Teoria secondo la quale una macchina può apprendere dati ed eseguire un compito specifico grazie al riconoscimento di specifici schemi sui dati e senza essere programmata per farlo. Questo approccio permette alla macchina di adattarsi in modo autonomo e di imparare da elaborazioni precedenti per produrre risultati sempre più affidabili e replicabili.

### N° of 1 trials

Questo rappresenta un modello di *trial* costituito da un singolo paziente concepito con lo scopo di superare i limiti di applicabilità dei risultati provenienti dai classici *Randomized Controlled Trials* (RCT) sul singolo individuo.

### Pseudoprogressione

Un modello atipico di risposta al trattamento osservato in un piccolo sottogruppo di pazienti trattati con l'immunoterapia (2-14%). Si caratterizza per l'incremento dimensionale di lesioni *target* o comparsa di nuove lesioni, seguita da una successiva riduzione del carico tumorale totale, in pazienti che ricevono trattamento con inibitori dei *checkpoint* immunologici (12).

### Spider plot

È una rappresentazione grafica della variazione percentuale dinamica della somma dei diametri di lesioni tumorali *target* (valutati secondo criteri RECIST) durante l'intero periodo di osservazione del paziente nello studio. Ciascun paziente è rappresentato da una linea il cui orientamento, rispetto a una retta orizzontale scelta come riferimento basale, indica le variazioni dimensionali del tumore durante tutto il periodo di valutazione del singolo soggetto.

### Studi a ombrello (*Umbrella trial*)

È uno studio clinico incentrato su un determinato istotipo tumorale, che si pone l'obiettivo di valutare l'efficacia di multipli trattamenti potenzialmente attivi verso diverse alterazioni molecolari presenti in un singolo istotipo tumorale. I pazienti con un unico tipo di tumore sono esaminati per la presenza di una serie di biomarcatori molecolari predefiniti e sulla base del biomarcatore indirizzati a ricevere il trattamento adeguato.

### Studio a canestro (*Basket trial*)

È uno studio clinico incentrato su un determinato biomarcatore molecolare, che si pone l'obiettivo di valutare l'efficacia clinica di un nuovo trattamento

indipendentemente dall'istologia tumorale. I pazienti sono reclutati solo sulla base delle caratteristiche molecolari del tumore, per cui anche tumori che hanno origine in organi diversi ma presentano le stesse alterazioni molecolari, possono ricevere lo stesso trattamento.

### Studio adattativo (*Adaptive trial*)

È uno studio clinico flessibile che prevede la possibilità di modificare alcuni aspetti del disegno statistico dello studio sulla base di risultati preliminari (solitamente derivati da un'analisi ad interim) acquisiti durante la conduzione del *trial*. Il requisito fondamentale alla base di studi adattativi metodologicamente corretti è rappresentato dalla pianificazione a priori delle eventuali modifiche previste, le quali devono essere sempre esplicitamente riportate in anticipo nel protocollo di studio.

### Studio randomizzato controllato (RCT)

È uno studio clinico nel quale si confronta una terapia sperimentale con la pratica standard che può essere rappresentata da una terapia di cui già si conosce l'effetto o da placebo o da nessun trattamento. L'assegnazione dei pazienti inclusi nello studio a ciascun intervento clinico avviene in modo casuale sulla base di criteri prestabiliti dai promotori della ricerca. Lo studio viene definito a "doppio cieco" quando né i pazienti né gli sperimentatori sono a conoscenza del tipo di trattamento ricevuto/prescritto; "a singolo cieco" quando solo i pazienti non sono a conoscenza del tipo di trattamento ricevuto. Uno studio clinico randomizzato rappresenta la tappa finale di una sperimentazione metodologicamente corretta che mira a dimostrare l'efficacia clinica di un nuovo principio attivo in particolare se si vuole procedere con la registrazione presso le autorità regolatorie.

### Swimmer plot

È una rappresentazione grafica che descrive i diversi momenti della risposta al trattamento di ciascun paziente durante l'intero periodo di osservazione nello studio. Il paziente è rappresentato da un rettangolo orizzontale che mostra la durata complessiva del trattamento, e che include al suo interno alcuni indicatori relativi ai diversi tipi di risposta (risposta completa o risposta parziale) osservati durante il periodo di valutazione nello studio e un indicatore specifico per i pazienti che mantengono la risposta al momento della valutazione.

### Virtual clinical trials

Questi *trials* rappresentano un nuovo metodo per raccogliere dati di individui arruolati all'interno di sperimentazioni cliniche. La novità è rappresentata dalla possibilità di utilizzare tecnologie di nuova generazione (dispositivo mobile, APP) e piattaforme social per condurre ogni fase della sperimentazione clinica (dall'arruolamento alla dispensazione del farmaco fino

alle visite di monitoraggio e rilevamento di efficacia ed eventi avversi) senza che il paziente debba spostarsi e facendo affidamento sui processi elettronici. Permette l'inclusione nei *trials* anche di anziani e persone che vivono in ambienti rurali.

### Waterfall plot

È una rappresentazione grafica della massima variazione percentuale rispetto al basale della somma dei diametri di lesioni tumorali *target* (valutati secondo criteri RECIST) durante il periodo di osservazione del paziente nello studio. Ciascun paziente è rappresentato da un rettangolo verticale il cui orientamento al di sopra o al di sotto di una retta orizzontale scelta come riferimento basale, indica rispettivamente la massima percentuale di crescita o riduzione delle dimensioni tumorali del singolo soggetto incluso nello studio.

### Windows of opportunity

In medicina questa espressione è utilizzata per definire un intervallo di tempo all'interno del quale è possibile eseguire un'azione che comporti un risultato desiderato. Di conseguenza, trascorso quel determinato tempo non sarà più possibile raggiungere il risultato atteso. Esempi sono la *golden hour* usata in medicina d'urgenza o il periodo critico durante l'accrescimento e lo sviluppo della neuroplasticità.

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. Yates LR, Seoane J, Le Tourneau C, et al. The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary. *Ann Oncol* 2018;29:30-5.
2. Russo A, Rosell R, Rolfo C eds. Targeted therapies for solid tumors. A Handbook for moving toward new frontiers in cancer treatment, current clinical pathology. New York (USA): Springer Science, 2015.
3. Davis AA, McKee AE, Kibbe WA, et al. Complexity of delivering precision medicine: opportunities and challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2018;38:998-1007.
4. Gruppo di Lavoro AIOM – SIAPEC-IAP – SIF – SIBioC: Raccomandazioni per l'esecuzione di indagini molecolari su biopsia liquida in oncologia. *Biochim Clin* 2019;43:106-14.
5. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15:81-94.
6. Biankin AV, Piantadosi S, Hollingsworth SJ. Patient-centric trials for therapeutic development in precision oncology. *Nature* 2015;526:361-70.
7. Kleppe M, Levine RL. Tumor heterogeneity confounds and illuminates: assessing the implications. *Nat Med*. 2014;20:342-4.
8. Martincorena I, Raine KM, Gerstung M, et al. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell* 2017;171:1029-41.

9. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes-the Achilles heel of cancer. *Science* 2002;297:63-4.
10. Fanale D, Maragliano R, Bazan V, et al. Caretakers and Gatekeepers, *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley Online Library 2017; doi.org/10.1002/9780470015902.a0006048.pub2.
11. Champiat S, Dercle L, Ammari S, et al. Hyperprogressive disease is a new pattern of progression in cancer patients treated by anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res* 2016;23:1920-8.
12. Lee JH, Long GV, Menzies AM, et al. Association between circulating tumor dna and pseudoprogression in patients with metastatic melanoma treated with anti-programmed cell death 1 antibodies. *JAMA Oncol* 2018;1:717-21.
13. Capoluongo E, Salvatore F. Medicina di precisione e medicina personalizzata: le nuove sfide del sistema sanitario. *Agenda Digitale*. <https://www.agendadigitale.eu/sanita/medicina-di-precisione-e-personalizzata-le-nuove-sfide-del-sistema-sanitario/>(ultimo accesso: novembre 2018).

## Esame emocromocitometrico: telemedicina e competenze

Sabrina Buoro<sup>1</sup>, Giorgio Da Rin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Qualità Aziendale, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>2</sup>Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

Caro Editore

nella recente rassegna "La Tele-ematologia nel consolidamento dei laboratori clinici", Giavarina et al. (1) hanno evidenziato come l'evoluzione tecnologica sia un elemento fondamentale da considerare nella ri-progettazione e organizzazione dei processi nell'ambito della medicina di laboratorio. Concordiamo con gli Autori nell'ineluttabilità dei percorsi di riordino e consolidamento della medicina di laboratorio e nell'importanza che le nuove tecnologie e l'*Information Communication Technology* hanno in questi processi. Vorremmo tuttavia sottolineare il ruolo fondamentale delle competenze dello specialista di medicina di laboratorio in questo contesto in evoluzione.

La diagnostica ematologica nella sua globalità, dall'emocromo, alla caratterizzazione immunofenotipica, genetica e molecolare è uno dei settori della medicina di laboratorio che maggiormente ha beneficiato del rapido progresso tecnologico (2,3).

L'emocromo è ampiamente richiesto dai clinici perché è un esame necessario per la valutazione dello stato di salute del paziente (4); è però uno degli esami più difficili da gestire nei processi di riordino dei laboratori in reti *hub&spoke*. L'emocromo è un esame multiparametrico la cui refertazione prevede l'integrazione dell'analisi automatizzata eseguita dai citometri a flusso con l'eventuale valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico, che talvolta porta alla formulazione di un referto commentato (4,5). La sua esecuzione deve essere garantita 24 ore su 24, con tempi di refertazione congrui alle esigenze cliniche; per queste ragioni quindi, non può essere completamente consolidata nel laboratorio *hub*. La sua gestione richiede la presenza di laboratoristi con adeguate competenze specialistiche, che in uno *spoke* difficilmente possono essere garantite costantemente nell'arco delle 24 ore.

Nel modello *hub&spoke*, la qualità delle prestazioni, la sicurezza del paziente e un adeguato contenuto informativo del referto devono essere garantite indipendentemente dalla sede di esecuzione dell'esame. Questo può avvenire solo attraverso il governo dell'integrazione tra competenze professionali e tecnologia. Sorgono pertanto due quesiti fondamentali:

- le competenze richieste ai professionisti che operano in un laboratorio *hub* o in uno *spoke*; devono essere uguali o differenziate in funzione del ruolo e del contesto clinico?
- la tecnologia è in grado di supportare il mantenimento della qualità e l'integrazione delle competenze?

Rispondere al primo quesito è semplice, in quanto le competenze richieste devono essere necessariamente differenziate in funzione della mission del laboratorio *hub&spoke*. Nell'*hub* sono consolidate le attività specialistiche e non, mentre nello *spoke* dovrebbe essere garantita solo l'esecuzione di prestazioni necessarie alla gestione dell'emergenza/urgenza in funzione della vocazione/*mission* della struttura sanitaria in cui è inserito.

Allo specialista che opera nello *spoke*, per la gestione e refertazione dell'emocromo sono richieste competenze di base (conoscenza della tecnologia in uso, interpretazione dei parametri quantitativi e qualitativi prodotti dallo strumento nonché della morfologia cellulare su striscio di sangue periferico) per essere in grado di riconoscere (2):

- il campione normale rispetto al campione che necessita di una valutazione più approfondita;
- la presenza di eventuali interferenti o artefatti come ad esempio: l'agglutinazione piastrinica in vitro da anticoagulante (pseudo-piastrinopenia);
- i blasti, incluso il loro conteggio differenziale; competenza necessaria per distinguere un caso di leucemia acuta da patologie proliferative croniche nelle quali l'urgenza d'intervento clinico è ben diversa. Nell'identificazione dei blasti, viene richiesta la capacità di distinguere la morfologia dei blasti della leucemia promielocitica acuta e del

---

Corrispondenza a: Sabrina Buoro, UOS Qualità Aziendale, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS, 1, 24127 Bergamo, Tel +39 035-2673161, E-mail sbuoro@asst-pg23.it

Ricevuto: 23.05.2019

Revisionato: 30.05.2019

Accettato: 21.06.2019

Pubblicato on-line: 12.07.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.056

linfoma di Burkitt, vere e proprie emergenze cliniche;  
- la morfologia delle emazie: in particolare gli schistociti fondamentali per la diagnostica differenziale della porpora trombotica trombocitopenica e le emazie falciformi.

Il punto fondamentale è come garantire allo specialista che opera nello *spoke* le competenze aggiornate di base per la gestione contemporanea dell'ematologia, coagulazione, biochimica clinica ed immunometria. E' fondamentale che le società scientifiche si adoperino a definire, programmare e avviare dei percorsi di formazione qualificanti specifici per questi specialisti, in analogia a quanto avviene nei corsi di formazione per medici di medicina generale.

In supporto alla gestione e controllo del processo di ematologia di laboratorio, la tecnologia offre sistemi *hardware* e *software* che permettono lo sviluppo di reti *web-based* di tele-ematologia con la possibilità di armonizzazione delle regole di valutazione dei risultati, e con la condivisione in tempo reale dei dati e delle informazioni, così da facilitare il processo di consulenza intra ed inter-laboratorio. Infine, l'innovazione tecnologica ha permesso lo sviluppo della revisione microscopica automatizzata con sistemi di digitalizzazione e pre-classificazione delle cellule presenti nello striscio di sangue periferico, con possibilità in loco o in collegamento da remoto, di riclassificazione e validazione da parte di un professionista esperto.

I sistemi di analisi digitalizzata dello striscio di sangue periferico permettono l'armonizzazione del processo di lettura dello striscio, garantiscono la tracciabilità del processo, l'ottimizzazione del tempo necessario per la revisione microscopica e facilitano la condivisione delle informazioni e delle conoscenze (7).

La qualità delle immagini e la capacità dei sistemi di digitalizzazione delle immagini per classificare correttamente le cellule è adeguata, ma non sostitutiva alla revisione microscopica in microscopia ottica; in particolare poi, la capacità dei sistemi di digitalizzazione delle immagini di pre-classificare correttamente le cellule si è dimostrata non sostitutiva delle competenze del laboratorista (8).

Il procedimento di revisione microscopica in microscopia ottica prevede, in accordo con la linea guida H20-A2 del *Clinical Laboratory Standards Institute* (9), una valutazione dello striscio di sangue a piccolo ingrandimento (200-400X), per l'osservazione del quadro d'insieme, e l'esecuzione del conteggio leucocitario differenziale a ingrandimento maggiore (1 000X) nella zona ottimale di lettura, per una accurata valutazione delle caratteristiche morfologiche delle cellule. L'approccio con la morfologia digitalizzata è sostanzialmente diverso e spesso caratterizzato da una visione parcellizzata del preparato. Quest'ultimo aspetto è un potenziale limite; un recente studio condotto sulla validità del dato morfologico, ottenuto in microscopia ottica, per la diagnostica differenziale delle sindromi mielodisplastiche, ha dimostrato che la concordanza diagnostica dei citomorfologi è elevata [0,85; intervallo di confidenza al 95% (CI95%) 0,80-0,89] per la classificazione diagnostica inter-osservatore del campione, ma si riduce notevolmente nella valutazione delle caratteristiche specifiche per singola cellula o linea cellulare fino a scendere a 0,59 (CI95% 0,46-0,69) (10).

L'impiego della morfologia digitalizzata nella pratica routinaria si sta progressivamente diffondendo per gli indiscutibili vantaggi documentati, per le opportunità future di sviluppo di sistemi più performanti, di intelligenza artificiale e di incremento delle piattaforme di *big-data*.

In questo momento così entusiasmante e ricco di opportunità, a nostro parere non viene data sufficiente importanza alla necessità di promuovere e documentare corretti percorsi di verifica e validazione di questi sistemi di analisi digitalizzata delle immagini, di verifica dell'efficienza ed efficacia diagnostica dei nuovi flussi operativi proposti e di qualificazione del personale deputato alla revisione microscopica digitalizzata.

Infatti, ad ora non è disponibile un documento che definisca limiti e regole di applicabilità della analisi morfologica digitalizzata al pari di quanto avviene per i conteggi in automazione (11), come pure le competenze che devono avere gli operatori che utilizzano questi sistemi, e i percorsi di verifica della qualità delle prestazioni strumentali e di verifica di qualità esterna.

Sicuramente il futuro della medicina di laboratorio e dell'ematologia di laboratorio sarà condizionato e supportato da strumenti innovativi come la morfologia digitalizzata e lo sviluppo di reti neurali, ma questa evoluzione non può prescindere dalla necessità di garantire il governo della tecnologia da specialisti di laboratorio con adeguate competenze in ambito ematologico e morfologico. E' auspicabile pertanto, come già sottolineato poco sopra, che le Società Scientifiche collaborino a definire il portafoglio minimo di competenze, che il professionista di laboratorio deve avere, in relazione alla tipologia della sede di lavoro, e istituiscano dei percorsi formativi *ad hoc*, con il fine di giungere all'accreditamento del professionista rispetto alle competenze definite e richieste.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Giavarina D, Carta M. La tele-ematologia nel consolidamento dei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2019;43:125-34.
2. Béné MC, Zini G. Research in morphology and flow cytometry is at the heart of hematology. *Haematologica* 2017;102:421-2.

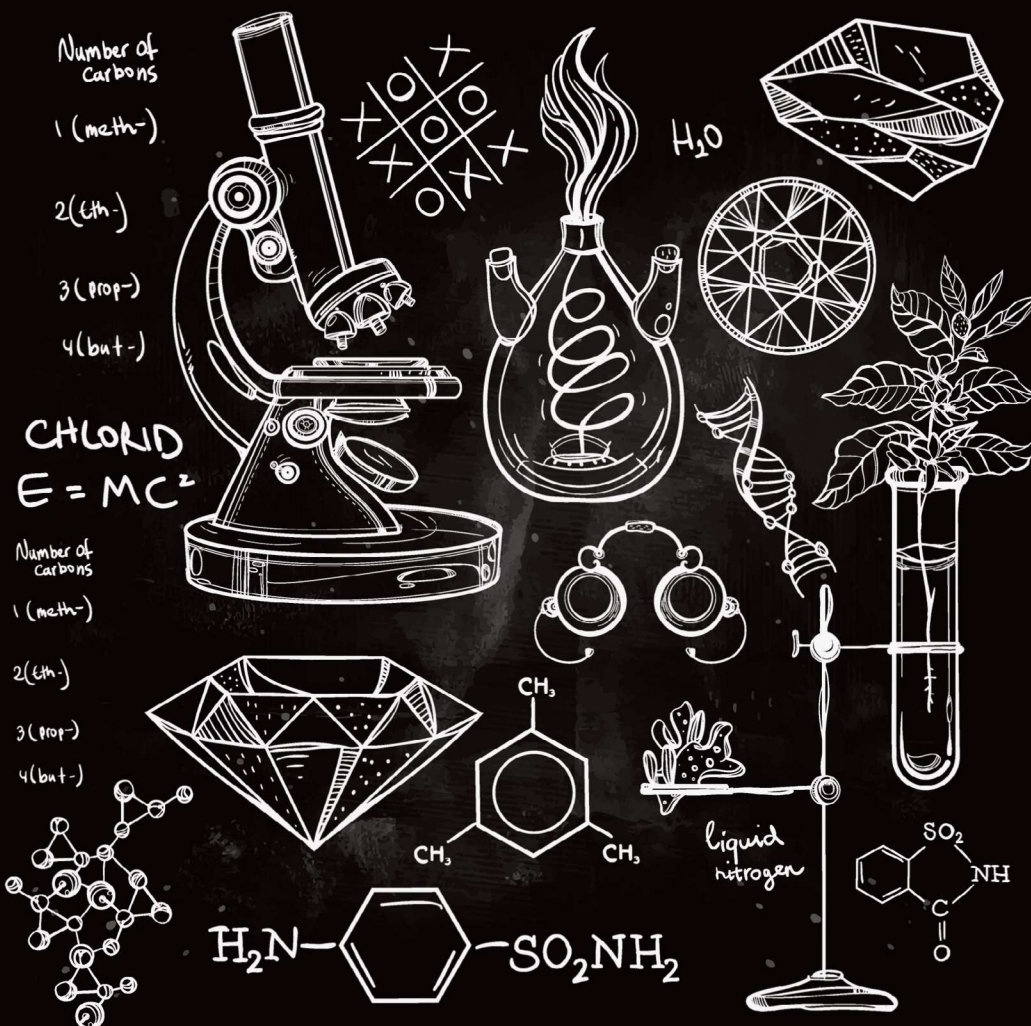
3. Béné MC, Grimwade D, Haferlach C, et al. European LeukemiaNet. Leukemia diagnosis: today and tomorrow. *Eur J Haematol* 2015;95:365-73.
4. Giavarina D. L'appropriatezza in medicina di laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:610-5.
5. Buoro S, Lippi G. Harmonization of laboratory hematology: a long and winding journey. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1575-8.
6. Buoro S, Da Rin G, Fanelli A, et al. Harmonization of interpretative comments in laboratory hematology reporting: the recommendations of the Working Group on Diagnostic Hematology of the Italian Society of Clinical Chemistry and Clinical Molecular Biology (WGDH-SIBioC). *Clin Chem Lab Med* 2018;57:66-77.
7. Da Costa L. Digital image analysis of blood cells. *Clin Lab Med* 2015;35:105-22.
8. Briggs C, Longair I, Slavik M et al. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system *Int J Lab Hematol* 2009;31:48-60.
9. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; approved guidelines, 2nd ed. CLSI document H20-A2. CLSI: Wayne, PA: 2010.
10. de Swart L, Smith A, MacKenzie M et al. Cytomorphology review of 100 newly diagnosed lower-risk MDS patients in the European LeukemiaNet MDS (EUMDS) registry reveals a high inter-observer concordance. *Ann Hematol* 2017;96:1105-12.
11. Barnes PW, McFadden SL, Machin S et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005;11:83-90.

È DISPONIBILE IL NUOVO VOLUME



# CASI CLINICI IN MEDICINA DI LABORATORIO

A cura di  
MARIA STELLA GRAZIANI e MAURO PANTEGHINI



Per saperne di più  
[www.biomedica.net](http://www.biomedica.net)

  
BIOMEDIA  
editore