

---

---

# BC

---

---

## biochimica clinica

**In questo numero:**

**RISCHIO CARDIOLOGICO NELLA ATTIVITÀ SPORTIVA**

*vedi pag. 24*

**DOCUMENTI:**

**GLOSSARIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE**

*vedi pag. 90*

**DOCUMENTI SIBioC:**

**BIOPSIA LIQUIDA IN ONCOLOGIA**

*vedi pag. 106*



SIBioC - Medicina di Laboratorio  
membro di

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



 **BIOMEDIA**  
La condivisione del sapere

# sommario



## EDITORIALI

11

L'avanzamento della biologia molecolare clinica nella diagnostica di laboratorio richiede importanti attività di armonizzazione  
*E. Capoluongo*

13

Nota all'Editoriale sul Documento della Organizzazione Mondiale della Sanità  
*F. Ceriotti, M.S. Graziani*

## RASSEGNE

14

Il ruolo della metabolomica nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie metaboliche ereditarie  
*M. Mussap, M. Zaffanello, V. Fanos*

24

La biologia molecolare clinica nella valutazione e prevenzione del rischio cardiologico nell'attività sportiva e nell'attività motoria intensa  
*C. Mazzaccara, V. D'Argenio, M. Nunziato, M.V. Esposito, F. Salvatore, G. Frisso*

## CONTRIBUTI SCIENTIFICI

44

La riorganizzazione del settore dedicato alla diagnostica proteica: un esempio virtuoso fondato su criteri di Evidence Based Laboratory Medicine e di sostenibilità economica  
*P. Natali, M. Varani, T. Trenti*

52

Disegno e sviluppo di una applicazione per dispositivi mobili per migliorare l'appropriatezza prescrittiva degli esami di laboratorio del medico di medicina generale: focus sull'ipertensione arteriosa  
*V. Pecoraro, L. Iaboli, F. Borsari, C. Cavalieri, M. Di Pietro, A. Roncaglia, S. Togni, T. Trenti*

59

Importanza dell'utilizzo di Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist nel disegno sperimentale di studi di variabilità biologica. Valutazione a confronto di due pubblicazioni sulla variabilità biologica della proteina S100- $\beta$  e dell'enolasi neurone specifica  
*G. Cajano, E. Guerra, M. Locatelli, F. Ceriotti, J. Díaz-Garzón Marco, P. Fernández-Calle, J. Minchinela, A.K. Aarsand, B.W. Berna Aslan, B. Boned, Z. Corte, A. Coskun, E. Gonzalez-Lao, N. Jonker, F. Marques-Garcia, C. Perich, C. Ricos, M. Simón, S. Sandberg, A. Carobene, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group on Biological Variation and Task Group for the Biological Variation Database*

## OPINIONI

67

La catena di custodia: problematiche generali ed esperienza nella Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 Centro  
*G. Canonico, D. Giardiello, A. Morani, P. Frassi, G. Friggeri, M.G. Galati, L. Vrenna, M. D'Amora*

## DOCUMENTI

76

Il Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation (GRADE) quale metodologia sistematica e trasparente per valutare l'esame di laboratorio nella formulazione di raccomandazioni e linee guida  
*V. Pecoraro, P. Pezzati, F. Balboni, T. Trenti per il Gruppo di Studio SIBioC Evidence Based Laboratory Medicine*

90

Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali  
*V. D'Argenio, F. Borrillo, F. Cariati, F. Di Maggio, R. Tomaiuolo*

## DOCUMENTI SIBioC

106

Raccomandazioni per l'esecuzione di indagini molecolari su biopsia liquida in oncologia  
*E. Capoluongo, M. Barberis, L. Crinò, R. Danesi, M. Del Re, S. Gori, A. Marchetti, C. Marchiò, N. Normanno, C. Pinto, A. Russo, A. Sapino, A. Sartore Bianchi, M. Truini, T. Venesio*

---

# sommario

---

## NOTIZIE SIBioC

**115**

In ricordo di Jillian (Jill) Tate  
*M.S. Graziani, M. Plebani*

**116**

Jill Tate: Mentoring as a life legacy  
*M.A. Vieira Willrich*

## CASI CLINICI

**e1**

Un caso di linfadenopatia, epatosplenomegalia e triptasi elevata  
*D. Avino, G. Abate, A. Di Palma, M. Gerarda Pirofalo, G. Morelli, P. Danise*

**e4**

Valutazione della risposta alla terapia in un paziente con amiloidosi AL e basse concentrazioni della catena leggera libera monoclonale  
*M. Basset, P. Milani, F. Russo, M. Nuvolone, F. Lavatelli, T. Bosoni, L. Pirolini, F. Li Bergolis, A. Foli, R. Albertini, G. Palladini, G. Merlini*

**e7**

Caso di emofilia A acquisita in paziente con sanguinamento endoculare  
*F. C. Agostino, R. Mattei*

# 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*  
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 1 - Marzo 2019

# biochimica clinica

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

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

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

Formato delle diverse tipologie di articoli.

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

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

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

**Le norme che seguono devono essere obbligatoriamente osservate, pena la non accettazione degli elaborati.** Per elaborati destinati a sezioni diverse dai Contributi Scientifici non è necessaria la suddivisione nei capitoli sotto menzionati. I Contributi Scientifici richiedono obbligatoriamente un Abstract in lingua inglese strutturato in "Introduction, Methods, Results, Discussion".

## PREPARAZIONE DEL MANOSCRITTO

I lavori sperimentali devono comprendere, nell'ordine, le seguenti parti.

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

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

**Abstract (riassunto in inglese, massimo 250 parole):** deve essere preceduto dal titolo in inglese, quando il lavoro è scritto in italiano.

**Non è richiesto il Riassunto in italiano.**

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

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

**Metodi:** descrivere in maniera esaustiva casistiche cliniche o di popolazione; reagenti chimici e biologici; kit diagnostici, calibratori, materiali di controllo; strumenti e sistemi analitici; metodi analitici; metodi statistici. Nel caso di utilizzo di reagenti e sistemi analitici commerciali di uso corrente è sufficiente indicare il principio del metodo e il sistema analitico commerciale impiegato. Nell'uso dei metodi statistici attenersi alle indicazioni riportate alla fine di queste Norme. Nel caso di utilizzo di casistiche cliniche e/o campioni biologici provenienti da soggetti umani è obbligatoriamente richiesta una dichiarazione (da inserire nel testo) che durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1964, emendata nel 2013 ([World Medical Association Declaration of Helsinki](#)) e, nel caso di utilizzo di campioni biologici appositamente raccolti, si è ottenuto un specifico Consenso Informato da ciascuno dei soggetti arruolati nello studio.

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

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

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

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

**Testo:** nello stesso formato di Discussione

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

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

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

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

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

1. Soper CPR, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic insulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:497-501.

2. Barrati J, Ettalbi M. Thermostable insulinases from *A. ficcum*. In: Fusch A, ed. Insulin and insulin-containing crops. London: Elsevier Science Publisher, 1993:211-6.

3. Constantin E, Schnell A, eds. Mass spectrometry. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1991.

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

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

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

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

## CASI CLINICI

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

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

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

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

**Bibliografia:** fino a un massimo di 10 voci bibliografiche.

**Tabelle/Figure:** non più di 2 in totale.

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

## INVIO ELETTRONICO DEL MANOSCRITTO

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

**Avvertenza importante:** Conservare copia di tutti i file inviati.

## IMPAGINAZIONE

### Testo e tabelle

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

Pagina 2. Abstract in lingua inglese.

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

**Figure**

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

**LETTERA DI ACCOMPAGNAMENTO**

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

**REVISIONE ED ACCETTAZIONE**

L'Editore di BC si riserva di accettare o meno i lavori inviati dopo consultazione di revisori esterni altamente qualificati. Modifiche di stile o di linguaggio nel testo o nell'iconografia possono essere introdotte direttamente nel corso della revisione editoriale e successivamente approvate dagli Autori.

**ESTRATTI**

Una volta pubblicato il lavoro, l'Autore corrispondente ne riceverà il file elettronico in .pdf, con l'implicito accordo che sarà sua responsabilità farne avere copia a eventuali coautori. Di norma non sono inviati estratti cartacei dei lavori pubblicati. A pagamento possono tuttavia essere prodotti estratti da fornire su richiesta.

**INDIRIZZO A CUI INVIARE GLI ELABORATI**

e-mail: [biochimica.clinica@sibioc.it](mailto:biochimica.clinica@sibioc.it)  
**Redazione di Biochimica Clinica**  
 Telefono 0245498282 int. 205

**ABBREVIAZIONI**

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

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

## LINEE GUIDA PER LA VALUTAZIONE STATISTICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Per l'analisi di correlazione è necessario indicare il tipo di correlazione utilizzata (ad esempio Pearson o Spearman), il coefficiente di correlazione con il relativo intervallo di confidenza ed il test  $t$  (gradi di libertà, valore del test, e valore  $p$ ). L'analisi di correlazione non deve essere utilizzata per la comparazione di metodi analitici. Preferire invece l'analisi di regressione (Deming o non parametrica di Passing-Bablok) e il diagramma di Bland-Altman (3-4).

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

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

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

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

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

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

**Approfondimenti:** the SAMPL Guidelines (5).

#### Bibliografia

1. EQUATOR Network: <https://www.equator-network.org/> (ultimo accesso: Dicembre 2018).
2. Ialongo C. Understanding the effect size and its measures. *Biochimica Medica* 2016;26:150–63.
3. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8476:307-10.
4. Vidali M, Tronchin M, Dittadi R, per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "Statistica per il laboratorio. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:129-42.
5. Lang TA, Altman DG. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: the "Statistical Analyses and Methods in the Published Literature" or the SAMPL Guidelines. *Int J Nurs Stud* 2015;52:5-9.

## L'avanzamento della biologia molecolare clinica nella diagnostica di laboratorio richiede importanti attività di armonizzazione

### Ettore Capoluongo

Responsabile UOSA Diagnostica Molecolare e Genomica  
Fondazione Policlinico Gemelli, IRCCS – Roma  
Coordinatore del Gruppo di Studio SIBioC Biologia Molecolare

Il mondo della diagnostica di laboratorio sta vivendo una continua rivoluzione che lo vede protagonista di un percorso integrato che porterà alla individualizzazione delle procedure diagnostiche e terapeutiche con un approccio che sarà sempre più quello della Medicina a target diversi, nell'ottica di quella che più semplicisticamente viene definita "Medicina di Precisione" o anche "Medicina Personalizzata".

In questo scenario così dinamico, le tecnologie di sequenziamento massivo parallelo (NGS) stanno contribuendo in modo sostanziale alla semplificazione dei processi di analisi del genoma, con possibilità di sequenziare sia piccoli pannelli di geni che esomi completi (le regioni codificanti del genoma) o interi genomi. Questa tipologia di analisi faciliterà sempre di più la possibilità di studiare sia le patologie sindromiche, ma anche quelle multifattoriali, con la possibilità di seguire l'evoluzione di patologie come il cancro attraverso l'analisi delle mutazioni somatiche che possono essere predittive di risposta o resistenza alle diverse linee di terapia. In tale contesto, si farà sempre più ricorso ad analisi quali *tumor mutational burden* (quantità di mutazioni/megabasi) o alla definizione del *genomic scar* (gli effetti sul genoma derivanti dai difetti di riparazione nel DNA), con possibilità, finora inimmaginabili, di monitorare da una parte l'evoluzione della patologia neoplastica e dall'altra di rimodulare la terapia a seconda del target emergente o assente nel paziente.

A tal fine è necessario che tutti gli operatori e i professionisti di laboratorio che si occupano di diagnostica molecolare, biologia molecolare clinica o medicina molecolare (termini tutti equipollenti in quanto indirizzati tutti alla individuazione delle basi molecolari della malattia) armonizzino la metrica e il linguaggio relativo alle procedure ed ai target diagnostici, sotto l'egida delle Società Scientifiche, Board Regolatori nazionali ed internazionali al fine di evitare confusioni terminologiche, ovviamente di nessuna utilità e potenzialmente fuorvianti. Tuttavia anche i laboratoristi che non si occupano direttamente della materia, ma ritengono di dover essere aggiornati in questo campo così dinamico e promettente, hanno necessità di comprendere a fondo il linguaggio utilizzato negli studi pubblicati che contengono sovente molti termini tecnici, non sempre del tutto facilmente e immediatamente comprensibili.

Il glossario pubblicato in questo numero della rivista (1) nella sua parte generale (parte I) rappresenta uno strumento di base ed una guida utile a chiarire gli aspetti terminologici che sono alla base di ogni indagine o esame molecolare. Pertanto, andrebbe impiegato come riferimento per tutti gli operatori di laboratorio, soprattutto per quei professionisti che sono in formazione specifica nel settore di diagnostica molecolare o che si avvicinano a questo settore sempre più in evoluzione. L'impiego di una corretta terminologia permette di riportare anche nella refertazione informazioni coerenti, corrette ed adeguate, tutti aspetti che sono sempre più importanti anche ai fini dell'accreditamento e della certificazione secondo gli standard ISO15189.

Il progetto globale della formulazione di questo glossario prevede la sua suddivisione in due parti distinte: la presente include i termini di base di biologia molecolare, mentre la seconda (che verrà pubblicata successivamente nel corso dell'anno) sarà specificamente dedicata alla biologia molecolare clinica, quindi focalizzata sulla terminologia da impiegare nelle sue applicazioni in diagnostica di laboratorio.

Pertanto, questo documento costituisce un importante e meritorio servizio ai soci SIBioC, permettendo di avvicinare i lettori di questo giornale ad un campo della medicina di laboratorio che rischia di apparire come frammentato o parcellizzato in troppi microsettori, ma che deve rifarsi agli stessi riferimenti terminologici, che restano imprescindibili per la cultura di ogni laboratorista che opera nel settore della biologia molecolare clinica anche al fine

---

Corrispondenza a: Ettore Capoluongo, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS, Università Cattolica, Roma  
ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it

Ricevuto: 05.02.2019

Revisionato: 05.02.2019

Accettato: 05.02.2019

Pubblicato on-line: 19.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.007

di allargare la platea dei cultori di questa affascinante materia.

Infine, a testimonianza delle attività che SIBioC ha intrapreso nell'ambito della armonizzazione in questo campo della diagnostica, questo numero di *Biochimica Clinica* pubblica un documento intersocietario (2) preparato in collaborazione con Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Farmacologia (SIF), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica-Divisione Italiana della International Academy of Pathology (SIAPEC-IAP) che rappresenta un importante documento di consenso contenente raccomandazioni per l'esecuzione di esami molecolari su biopsia liquida in oncologia. Il documento raccomanda comportamenti uniformi in tema di definizioni, procedure pre-analitiche e analitiche nonché di modalità di refertazione nei diversi Centri che si occupano di questo tipo di diagnostica e costituisce quindi un notevole avanzamento verso l'armonizzazione di questa particolare diagnostica.

1. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali. *Biochim Clin* 2019. doi
2. SIBioC, AIOM, SIF, SIAPEC-IAP. Raccomandazione di consenso per l'esecuzione di esami molecolari su biopsia liquida in oncologia. *Biochim Clin* 2019. doi

## Nota all'Editoriale sul Documento della Organizzazione Mondiale della Sanità

**Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>, Maria Stella Graziani<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

L' editoriale pubblicato su *Biochim Clin* 2018;42:283-4 relativo al documento della Organizzazione Mondiale della Sanità sulla diagnostica in vitro, elencava alcuni errori relativi alle indicazioni per gli esami di chimica clinica, auspicandone la correzione nella successiva revisione prevista per il 2019.

Gli Autori dell'editoriale desiderano portare all'attenzione dei lettori di *Biochimica Clinica* che a novembre 2018 è stata resa disponibile una revisione del documento (non prevista inizialmente) nella quale molti degli errori segnalati sono stati corretti. La versione aggiornata è disponibile come materiale supplementare (1S).

In particolare, l'albumina come biomarcatore dello stato di nutrizione è stata inserita tra gli esami di II livello, da eseguirsi correttamente su siero/plasma (anziché su urine come in precedenza); il glucosio misurato con striscia reattiva è incluso solo nelle indagini di I livello, mentre nel II livello ne è prevista la determinazione utilizzando uno strumento di chimica clinica; contestualmente, la determinazione della glicosuria è stata eliminata; per amilasi e lipasi è stata eliminata la misura su urine.

Con tutta evidenza, le istanze della comunità professionale della medicina di laboratorio sono state accolte (anche se non nella loro interezza) e di questo non ci si può che rallegrare.

---

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona. E-mail [mariastella@graziani.eu](mailto:mariastella@graziani.eu)

Ricevuto: 07.01.2019

Accettato: 07.01.2019

Pubblicato on-line: 19.02.2019

## Il ruolo della metabolomica nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie metaboliche ereditarie

Michele Mussap<sup>1</sup>, Marco Zaffanello<sup>2</sup>, Vassilios Fanos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Cagliari, Cagliari Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Odontoiatriche, Ginecologiche e Pediatriche, Università di Verona, Italia

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Unità di Terapia Intensiva Neonatale, Istituto di Puericultura, Sezione Neonatale, Università di Cagliari, Italia

Traduzione a cura di Roberta Pintus (Cagliari)

### ABSTRACT

**Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism.** Timely newborn screening and genetic profile are crucial in early recognition and treatment of inborn errors of metabolism (IEMs). A proposed nosology of IEMs has inserted 1015 well-characterized IEMs causing alterations in specific metabolic pathways. With the increasing expansion of metabolomics in the clinical biochemistry and laboratory medicine communities, several research groups have focused their interest the analysis of metabolites and their interconnections in IEMs. Metabolomics has the property to extend metabolic information leading to achieve an accurate diagnosis for an individual patient and to discover novel IEMs. Structural and functional information on 247 metabolites associated with 147 IEMs and 202 metabolic pathways involved in various IEMs have been reported in the human metabolome data base (HMDB). For each metabolic gene, a new computational approach can be developed for predicting a set of metabolites that are expected to change their concentration in urine, blood and other biological fluids after gene knockout. Both the targeted and the untargeted mass spectrometry (MS)-based metabolomic approaches have been used to expand the range of disease-associate metabolites. The quantitative targeted approach, in conjunction with chemometrics, can be considered a basic tool for validating known diagnostic biomarkers in various metabolic disorders. The untargeted approach increases the identification of new biomarkers in known IEMs and allows pathways analysis. Urine is an ideal biological fluid for metabolomics in neonatology; however, the lack of standardization of the preanalytical phase may originate potential interferences in metabolomic studies. Integrating genomic with metabolomic data represents the current challenge for improving diagnosis and prognosis of IEMs. The goals consist of the identification of both metabolically active loci and genes relevant to a disease phenotype, that means deriving disease-specific biological insights.

### INTRODUZIONE

Il concetto di malattie metaboliche ereditarie, definite anche errori congeniti del metabolismo (ECM) fu introdotto nel 1908 da Sir Archibald E. Garrod, un medico inglese che descrisse in alcuni pazienti la presenza di quattro malattie trasmesse geneticamente:

alcaptonuria, albinismo, cisteinuria e pentosuria (1). Egli intuì che queste malattie permangono tutta la vita e sono causate da specifici deficit parziali o totali di attività enzimatiche. Ciò comporta il blocco parziale o totale di specifiche vie metaboliche, con varie conseguenze, tra cui: deficit di biosintesi di prodotti terminali, accumulo di precursori o prodotti intermedi delle vie metaboliche e

---

*Questo articolo è la traduzione di Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. Ann Transl Med 2018;6:338 con il permesso dell'Editore. L'articolo originale è disponibile come materiale supplementare (1S). Annals of Translational Medicine non è responsabile della accuratezza della traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale.*

---

Corrispondenza a: Michele Mussap, Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Cagliari, Cagliari Italia. E-mail michele.mussap@unica.it

Ricevuto: 03.01.2019

Accettato: 03.01.2019

Pubblicato on-line: 22.01.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.002

alterazioni di molecole complesse. Le patologie correlate a questi difetti sono spesso caratterizzate da intossicazioni o da deficit energetici. Garrod introdusse un concetto del tutto innovativo per la sua epoca, quello di "individualità chimica", dimostrando una visione pionieristica della biologia dei sistemi (2). Questa sua peculiare visione fu di enorme importanza nel trasferire il concetto di individualità chimica in una visione dinamica delle malattie ereditarie e dei difetti congeniti del metabolismo, includendo fattori genetici e non. Oggi questa visione si traduce nello studio delle interrelazioni tra genetica, epigenetica, proteomica e metabolomica. Garrod ipotizzò che ogni singolo enzima sia controllato da un solo gene; curiosamente, all'epoca di Garrod non si conosceva la natura proteica degli enzimi. L'importanza delle teorie di Garrod è stata a lungo sottovalutata per vari motivi. Anzitutto all'epoca di Garrod le cure mediche disponibili non traevano alcun beneficio sostanziale dalla scoperta della natura ereditaria di queste malattie. Inoltre, la loro prevalenza apparentemente bassa indusse la medicina dell'epoca a considerarle clinicamente irrilevanti. Oggi, in base alla definizione di malattia rara (3), la prevalenza delle malattie metaboliche ereditarie è individualmente rara; tuttavia, se si considera la prevalenza globale di queste malattie, si raggiunge una stima di circa 1 caso ogni 1000 persone sane (4). Anche i genetisti sottovalutarono le scoperte di Garrod, a causa della loro limitata conoscenza sia dei principi mendeliani che della struttura dei geni. Probabilmente, l'ostacolo più rilevante per la diffusione pervasiva della teoria di Garrod fu l'influenza dominante della scuola dei biometristi che agli inizi del XX secolo si contrapposero per circa 20 lunghi anni alla scuola dei mendeliani, fino alla formulazione della celebre opera integrativa sintesi moderna, che finalmente coniugò la genetica con l'evoluzione (5). Nella seconda edizione del volume "Errori congeniti del metabolismo", pubblicata da Garrod nel 1923, furono descritti due ulteriori malattie metaboliche ereditarie: la porfiria eritropoietica congenita e la steatorrea congenita (6). Da allora, sono state descritte centinaia di malattie metaboliche ereditarie. In base a criteri molto rigorosi, recentemente sono stati definiti 1015 ECM, causa di alterazioni in specifiche vie metaboliche; ulteriori 111 potrebbero essere aggiunti, ma non rispettano ancora tutti i criteri di inclusione in questa classificazione sistematica (7). Le malattie metaboliche ereditarie rappresentano circa l'80% delle cosiddette malattie rare (orfane), nonostante la loro prevalenza sia molto variabile, da 25:100.000 per l'ipotiroidismo congenito a 0,4:100.000 per la malattia delle urine a sciroppo d'acero (chetoaciduria a catena ramificata). Nella maggior parte dei casi, sono presenti difetti negli enzimi e nelle proteine di trasporto, che causano o una produzione inadeguata di intermedi metabolici ad alta energia, ormoni, proteine,

lipidi, metaboliti e altre sostanze fondamentali, o un accumulo di metaboliti tossici. A causa della loro considerevole eterogeneità, le malattie metaboliche ereditarie possono essere classificate con vari criteri; molti di quelli presenti in letteratura sono basati sul tipo di caratteristiche cliniche, sulla fisiopatologia, sul tipo di enzima o di organello cellulare coinvolti e su altri criteri. In definitiva, non esiste un sistema universale di classificazione. La Società per lo Studio degli Errori Congeniti del Metabolismo (SSIEMs) ha raggruppato le malattie metaboliche ereditarie in gruppi omogenei di malattie caratterizzate da alterazioni della stessa via metabolica, individuate con la stessa metodologia diagnostica, e trattate con gli stessi protocolli terapeutici in emergenza e nel monitoraggio a lungo termine (8). Una recente classificazione divide le malattie metaboliche ereditarie in due ampie categorie: (a) quelle che interessano un unico sistema funzionale o un unico organo; (b) quelle caratterizzate da alterazioni biochimiche o di una via metabolica comune a un ampio numero di cellule/organi, o limitate ad un organo specifico, ma causa di disturbi e disfunzioni sistemiche (9). Queste ultime sono state ulteriormente suddivise in tre sottogruppi: disordini del metabolismo intermedio che interessano piccole molecole; disordini che riguardano principalmente il metabolismo energetico; disordini che coinvolgono molecole complesse (Tabella 1).

## IL LABORATORIO NELLO SCREENING DELLE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

Lo screening neonatale tempestivo e il profilo genetico sono due strumenti strategici per il riconoscimento precoce e il trattamento immediato degli ECM. Nella maggior parte dei Paesi sviluppati, e in vari Paesi in via di sviluppo, ogni neonato è sottoposto a screening attraverso un test su goccia di sangue essiccato su cartoncino ("Dry Blood Spot" - DBS). Un ritardo diagnostico può avere conseguenze molto gravi e comportare scompensi metabolici acuti, danni neurologici progressivi, o addirittura morte del neonato. L'approccio laboratoristico per gli screening neonatali può essere riassunto schematicamente in 4 fasi: (a) un test di screening metabolico generale; (b) determinazioni di specifici metaboliti; (c) studi sugli enzimi coinvolti; (d) test genetici di analisi del DNA. Dal momento della loro introduzione nei piani nazionali di prevenzione, i programmi di screening neonatali si sono allargati a molte malattie fino ad includerne più di 50, comprese le aminoacidopatie, le acidemie organiche, i disordini dell'ossidazione degli acidi grassi, e le malattie da accumulo lisosomiale. La diagnosi definitiva è basata su esami più specialistici, come ad esempio il profilo di aminoacidi, acilcarnitina, acidi grassi liberi, piruvato,

<sup>1</sup>In Italia la Legge n.167 del 19.08.2016 ha reso obbligatorio lo screening neonatale metabolico allargato, che deve essere effettuato su tutti i nuovi nati, indipendentemente dalla nazionalità e dal centro di nascita pubblico, privato o a domicilio (NDT).

**Tabella 1**

*Classificazione degli errori congeniti del metabolismo (ECM) ristretti ad un organo ma con coinvolgimento sistemico [modificata da Saudbray JM, et al. (9)]*

Errori congeniti del metabolismo, categoria 2:

**A. Disordini del metabolismo intermedio che coinvolgono piccole molecole**

Catabolismo degli aminoacidi

La maggior parte delle acidurie organiche

Difetti del ciclo dell'urea

Difetti del galattosio e del fruttosio

Porfirie

Disordini dei metalli

Sintesi dei neurotrasmettitori

Sintesi degli aminoacidi del cervello

**B. Disordini che coinvolgono elettivamente il metabolismo energetico**

Deficit del trasportatore cerebrale del glucosio

Deficit del trasportatore epato-intestinale del glucosio

Difetti mitocondriali

Difetti del metabolismo energetico citoplasmatico

**C. Disordini che coinvolgono molecole complesse**

Malattie da accumulo lisosomiale

Disordini perossisomiali

Sindrome da glicoproteina con deficit di contenuto in carboidrati

Purine e pirimidine

Sintesi del colesterolo e degli acidi biliari

Trigliceridi intracellulari, fosfolipidi, sintesi e rimodellamento dei glicosfingolipidi

acetoacetato, 3-idrossibutirrato, mucopolisaccaridi e oligosaccaridi, nonché determinazioni di attività enzimatiche, funzionali, e analisi mutazionali<sup>1</sup>. Nel 1980, la spettrometria di massa tandem (MS/MS) è stata introdotta come metodo di riferimento per lo screening neonatale, grazie alla sua capacità di individuare un ampio spettro di ECM che in precedenza non erano riconosciuti con il test su goccia di sangue essiccato. Attualmente, la MS/MS è usata in routine per lo screening neonatale degli ECM; si tratta di un metodo rapido, altamente sensibile e specifico, che richiede volumi di campione molto bassi, e che possiede un'elevata efficienza. Nel 2004 fu lanciato un progetto collaborativo, chiamato "Region 4 Stork" (R4S), considerato un obiettivo prioritario di un progetto più vasto ("Regional Genetics Collaborative Project") finanziato dall'agenzia federale americana "U.S. Health Resource and Service Administration" (HRSA). Gli scopi principali furono di facilitare l'introduzione universale dello screening neonatale con la MS/MS e di eseguire gli esami di conferma, allo scopo di migliorare la qualità analitica dello screening neonatale esteso (10). Il progetto conteneva altri tre obiettivi: (a) uniformare i

pannelli di test eseguiti in MS/MS, allargando al massimo il riconoscimento di neonati con malattia metabolica ereditaria; (b) migliorare le prestazioni analitiche; (c) raggiungere e mantenere le quote più basse possibili di risultati falsi negativi e falsi positivi (11). Il vero catalizzatore di questo progetto è un software che consente l'analisi multivariata per il riconoscimento e la classificazione di profili metabolici complessi ("Collaborative Laboratory Integrated Reports" - CLIR) e che quindi migliora significativamente le interpretazioni post-analitiche (12). Grazie a questo supporto sono stati identificati 114 biomarcatori da introdurre nello screening neonatale (13). Nel 2012, il database R4S è diventato parte del "Newborn Screening Transnational Research Network", un'iniziativa finanziata dal "National Institute of Child Health and Human Development" (NICHD).

**METABOLOMICA, METABOLITI E METABOLOMA**

Metabolomica e metabolismo hanno una radice comune "μεταβολή" (metàbole), che in greco significa cambiamento. Il termine metabolomica, che definisce

l'analisi globale delle piccole molecole coinvolte nelle vie metaboliche degli organismi viventi, è stato coniato da Oliver Fiehn nel 2002 (14). Attraverso l'uso di tecnologie ad elevata efficienza, la metabolomica permette di identificare e quantificare i metaboliti presenti in un campione biologico. In precedenza era stato introdotto il termine metabonomica, che a sua volta definisce l'analisi della risposta dinamica metabolica alle variazioni biochimico-fisiche che si susseguono nel tempo nei sistemi viventi attraverso l'uso di appropriate tecniche analitiche e specifici approcci statistici (15). Tuttavia, nella maggior parte dei lavori scientifici della letteratura, metabolomica e metabonomica sono usati in modo quasi completamente intercambiabile, sia perché le loro definizioni sono in gran parte sovrapponibili, sia perché i metodi analitici e i modelli statistici sono gli stessi (16). Con il termine metabolita si identificano tutte le molecole con peso molecolare inferiore a circa 1800 Dalton. I metaboliti sono substrati o prodotti che fanno parte delle vie metaboliche (17). Metaboliti endogeni come lipidi, glucidi e aminoacidi derivano dal metabolismo cellulare ed entrano nei processi di trasferimento energetico o in quelli di comunicazione intercellulare. In un sistema biologico, i metaboliti sono soggetti a cambiamenti repentini della loro concentrazione e della loro combinazione all'interno del sistema, in risposta a cambiamenti fisiopatologici e a trattamenti terapeutici. Per questi motivi, i metaboliti sono una preziosa e puntuale fonte di informazione, consentendo di individuare alterazioni nei cicli metabolici alterati da processi patologici o da terapie in atto. In senso lato, la metabolomica si può considerare una delle più antiche scienze mediche e biologiche. Nell'antica Grecia, all'odore e sapore dolciastrici delle urine, era stata associata la presenza di glucosio, un metabolita che nei soggetti diabetici conferisce al liquido biologico questa proprietà organolettica. Nei moderni laboratori clinici, la maggior parte degli esami eseguiti in routine consiste nella misura della concentrazione di metaboliti nel sangue e nell'urina, come ad esempio acido urico, glucosio, creatinina e così via. Questo modello tradizionale, ancorché valido e basato sull'ipotesi diagnostica, è un approccio riduzionistico, perché non permette né la completa caratterizzazione molecolare di un sistema biologico, né un'analisi sistematica delle complesse interrelazioni funzionali tra i vari metaboliti. D'altra parte, la metabolomica offre una visione olistica integrata "top-down" della biochimica negli organismi complessi. Ciò delimita una fondamentale differenza tra l'attuale valutazione dei singoli costituenti biochimici e l'analisi dell'intero insieme di metaboliti rinvenibili in un liquido biologico, in una cellula o in un estratto di tessuto, cioè in altre parole consente la caratterizzazione del profilo metabolico. Quest'ultimo fornisce una visione dettagliata del "network" metabolico e della sua dinamicità, offrendo una mole di dati biochimici che possono essere analizzati e interpretati, e dimostrando che il tutto è più della semplice somma delle parti come sostenne Aristotele più di duemila anni fa (18). Nel 1998, Oliver coniò il termine metaboloma, definendolo la

somma olistica quantitativa dei metaboliti in un determinato campione biologico (19). In seguito, la definizione è stata modificata, e il metaboloma è stato ridefinito come il fenotipo molecolare che deriva dall'interazione tra il genotipo e l'ambiente circostante (20). Il metaboloma rappresenta l'impronta digitale molecolare di un liquido biologico o di un tessuto, ed è dinamico, perché varia nel tempo. Modificazioni nella composizione, nella concentrazione e nelle interazioni tra metaboliti dipendono dallo sviluppo di complesse influenze reciproche tra i vari organi, l'ambiente e il microbioma. Nonostante il termine ambiente comprenda un ampio spettro di definizioni, si può riassumere che per ambiente si intendono tutti i fattori non genetici che influenzano l'omeostasi delle reazioni biochimiche sequenziali nelle vie metaboliche.

## METODI ANALITICI IN METABOLOMICA

Il metaboloma umano possiede un alto grado di complessità e pertanto richiede l'uso di piattaforme analitiche, metodi e analisi dei dati specifici molto più sofisticati se confrontati con quelli usati per le altre scienze omiche. Infatti, genomica, trascrittomica e proteomica consistono nello studio di grandi molecole (DNA, RNA, proteine) costituite da unità semplici, rispettivamente nucleotidi e aminoacidi per acidi nucleici e proteine. Ne consegue che ciò che conta per l'identificazione e l'analisi funzionale di DNA, RNA e proteine è la sequenza di nucleotidi e aminoacidi lungo la catena molecolare, strettamente correlata alla corrispondente informazione biologica. Al contrario, per l'analisi del metaboloma non può esistere un approccio sequenziale; i metaboliti devono essere individuati e differenziati singolarmente e selettivamente; inoltre, il riconoscimento e l'analisi quantitativa dei metaboliti è resa complessa dall'ampio ambito di variabilità molecolare qualitativa e quantitativa (21). Non meno rilevante è la diversità tra i vari metaboliti, sia a livello individuale che in gruppo, dovuta alle loro diverse proprietà chimico-fisiche. Questo elevato grado di variabilità costituisce la maggiore criticità analitica e interpretativa della metabolomica. I metodi più usati, in grado di ricavare ampie basi di dati strutturati da una complessa miscela di metaboliti presenti in un liquido o tessuto biologico, sono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ("Nuclear Magnetic Resonance" - NMR) e la spettrometria di massa ("Mass Spectrometry" - MS). L'NMR misura una proprietà magnetica intrinseca dei nuclei atomici, cioè lo spin (22). L'approccio NMR più comunemente usato negli studi di metabolomica è la spettroscopia NMR del protone ( $^1\text{H-NMR}$ ). Questo metodo possiede diversi vantaggi (23), tra cui il più importante è l'assenza di pretrattamenti specifici del campione, come la derivatizzazione. In tal modo si evita la manipolazione del campione e la potenziale alterazione, anche parziale, della struttura dei metaboliti; inoltre si riducono eventuali interferenze dovute alla co-migratazione di metaboliti usati nella fase preparativa del campione. Ulteriori vantaggi derivano dai tempi analitici

ridotti, da un ampio potere discriminante delle classi chimiche e da un'elevata riproducibilità dei risultati. La MS è molto diffusa negli studi di metabolomica, perché meno costosa della NMR, più semplice da usare e molto più sensibile, il che permette di riconoscere e misurare quantità molto basse di metaboliti e di caratterizzare fenotipi molecolari complessi. Negli studi di metabolomica basati sulla MS si possono usare due approcci principali: l'iniezione diretta del campione biologico nella sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa (questo metodo è usato raramente); MS associata a tecniche separative ad alta risoluzione come la cromatografia liquida (LC-MS), la gas cromatografia (GC-MS) e l'elettroforesi capillare (CE-MS). Questi metodi di separazione preventivi riducono la complessità degli spettri di massa, fornendo ulteriori informazioni sulle proprietà fisico-chimiche dei metaboliti. Il metodo d'infusione diretta ha il vantaggio di essere molto utile per quantificare i metaboliti nelle miscele complesse. Ciononostante, può indurre una massiva soppressione ionica, impedendo la separazione dei composti isobarici e isomerici (24). Attualmente, la LC-MS è la combinazione più largamente usata per il profilo mirato sia dei composti polari che di quelli non polari; la CE-MS è utile per l'analisi di metaboliti polari, mentre la GC-MS è utile nell'analisi dei metaboliti volatili nativi o di quelli resi volatili dopo derivatizzazione chimica (25). La cromatografia liquida a ultra prestazione ("Ultra Performance Liquid Chromatography" -UPLC) e la cromatografia a fluido supercritico (Supercritical Fluid Chromatography - SFC) accoppiate alla MS hanno migliorato l'efficienza e la sensibilità analitica. In particolare, l'uso di queste tecniche porta ad una separazione ad alta risoluzione dei lipidi, che costituiscono un vasto sottogruppo del metaboloma umano e devono essere accuratamente analizzati in molte malattie metaboliche ereditarie. La notevole variabilità di concentrazione e di strutture chimiche tra i vari metaboliti inducono sempre più i ricercatori ad usare in parallelo almeno due metodi analitici, ad esempio NMR e MS (26). In assoluto, infatti, nessuna tecnologia usata singolarmente è in grado di caratterizzare definitivamente l'intero metaboloma presente in un campione biologico (27).

### LA METABOLOMICA NELLA DIAGNOSTICA DEGLI ERRORI CONGENITI DEL METABOLISMO

Con la crescente diffusione degli studi di metabolomica nella comunità scientifica, vari gruppi di ricerca hanno focalizzato il loro interesse sull'applicazione di questa scienza omica nella diagnosi e gestione degli ECM, con lo scopo di approfondire l'analisi dei metaboliti e delle loro interrelazioni. Nonostante il suo indiscutibile valore e il suo ruolo primario nei programmi di salute pubblica, lo screening neonatale possiede alcuni limiti, soprattutto perché offre una visione istantanea su un ridotto gruppo di alterazioni metaboliche (circa 50 su oltre 1015); inoltre, alcuni ECM

non sono identificabili attraverso i programmi routinari di screening neonatale. D'altra parte, il profilo metabolico può fornire un contributo significativo per aumentare le informazioni sulle alterazioni dei processi metabolici, con due scopi principali: raggiungere un'accurata diagnosi ed individuare nuovi ECM (28-30). Tuttavia, genetica e metabolomica non si escludono a vicenda: per ogni alterazione genica correlata a un difetto metabolico può essere sviluppato un nuovo modello computazionale che, dopo il "knockout" genico, è in grado di prevedere variazioni di concentrazione di un insieme di metaboliti nelle urine, nel sangue e in altri liquidi biologici (31). Nella banca dati del metaboloma umano ("Human Metabolome Database" - HMDB) sono archiviate informazioni strutturali e funzionali di 247 metaboliti associati a 147 ECM e 202 cicli metabolici coinvolti in altri ECM. Questa banca dati fu fondata nel 2005 da un progetto multi-istituzionale e multi-nazionale ("Human Metabolome Project") (32), ed è stata ideata per facilitare l'interpretazione delle relazioni tra geni, ECM e metaboliti (33). La banca dati è fondamentale come supporto per chiarire quali vie metaboliche sono compromesse o bloccate in un determinato ECM e inoltre per facilitare la scoperta, l'identificazione e la quantificazione di metaboliti chiave nei pazienti con malattia metabolica ereditaria. Nell'ultima decade, sono stati pubblicati numerosi studi di metabolomica applicata agli ECM, con un particolare interesse per quelle malattie che mostrano una spiccata variabilità fenotipica e genotipica tra i vari pazienti e pertanto difficili da diagnosticare attraverso i programmi di screening neonatale. Un caso esemplificativo è costituito dalla malattia di Fabry, una patologia complessa da accumulo lisosomiale, multisistemica e caratterizzata dalla mutazione del gene *GLA*, situato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq21.33-Xq22), che causa il deficit dell'enzima  $\alpha$ -galattosidasi A. Ciò provoca l'accumulo di globotriaosilfosfingosina (lyso-Gb3) nei tessuti e nei liquidi biologici e di globotriaosilceramide (Gb3) nei lisosomi. Attraverso l'associazione UPLC-MS ionizzazione per elettrobulizzazione-tempo di volo (UPLC-ESI-TOF-MS), un gruppo di ricerca canadese ha effettuato una serie di ricerche finalizzate alla scoperta di nuovi biomarcatori in grado di svelare la gravità e la progressione della malattia. In una sequenza di studi consecutivi, questi ricercatori hanno trovato fino a 15 isoforme/analoghi della Gb3 (34-37) e 22 isoforme/analoghi della galabiosilceramide (Ga2) nelle urine di pazienti con la malattia di Fabry non trattati (38). La scoperta di queste isoforme ha contribuito a fornire nuove conoscenze sulla fisiopatologia della malattia di Fabry e sui meccanismi responsabili di alterazioni delle vie metaboliche.

Gli studi di metabolomica si basano su due approcci: l'analisi quantitativa di classi di metaboliti a struttura nota, il cosiddetto approccio "targeted"; l'analisi globale di tutti i metaboliti presenti in un campione biologico, il cosiddetto approccio "untargeted". Quest'ultimo non solo permette una visione d'insieme di tutti i metaboliti conosciuti e sconosciuti in un unico esame, ma è molto

usato per determinare le alterazioni delle vie metaboliche (39). In pratica, l'approccio "untargeted" può essere considerato come un'indagine in grado di rilevare qualsiasi metabolita presente in quantità misurabile. Entrambi gli approcci "targeted" e "untargeted" basati sulla MS sono largamente usati per incrementare il numero di metaboliti conosciuti associati a processi patologici (40).

### Metabolomica "targeted" negli ECM

Numerosi studi di metabolomica hanno usato l'approccio "targeted" quantitativo, associato alla chemiometria, nella valutazione degli ECM, anche per convalidare tipo e ruolo di biomarcatori noti. In particolare, le aminoacidopatie, le acidurie organiche e i disordini dell'ossidazione degli acidi grassi sono tra gli ECM più studiati usando l'approccio "targeted" (30). Un recente lavoro ha valutato, mediante approccio "targeted" LC-MS/MS, un ampio pannello metabolico che comprendeva 220 metaboliti clinicamente rilevanti in uno spettro di ECM (41). La valutazione è stata fatta: su campioni di tessuto di animali, su 20 volontari adulti sani e su 56 campioni di sangue essiccato su cartoncino da pazienti con 8 diversi ECM. I risultati hanno dimostrato che il pannello è potenzialmente utile come strumento di screening sensibile e robusto per un ampio gruppo di ECM e permette di evitare molte determinazioni lunghe e costose, spesso causa di ritardi diagnostici. L'analisi di 163 metaboliti nel plasma di 50 controlli e 34 pazienti con difetti del metabolismo aminoacidico, acidurie organiche e difetti mitocondriali, ha permesso di individuare tutti i pazienti affetti da ECM, ottenendo una completa discriminazione tra ciascun campione dei pazienti e i controlli (42). Un altro studio di metabolomica "targeted" ha valutato, nella malattia di Niemann-Pick C1 (NPC1), le concentrazioni di specifici sfingolipidi plasmatici, correlandole al tipo di risposta alla terapia (43). Come noto, anomalie nel metabolismo degli sfingolipidi sono tipiche della malattia NPC1. Usando la MS, i ricercatori hanno identificato un pannello di sfingolipidi nel plasma e nel liquor che aumentano nei soggetti affetti da NPC1; ancor più rilevante è stata l'osservazione che le variazioni di questi sfingolipidi erano strettamente correlate all'esito del trattamento terapeutico, sia nei modelli animali che nei pazienti.

### Metabolomica "untargeted" negli ECM

L'approccio metabolomico "untargeted" è più descrittivo rispetto al "targeted". In un'unica analisi "untargeted" si ricavano miriadi di informazioni, diversamente ottenibili solo mediante pannelli "targeted" multipli per acidi organici, intermedi della biosintesi della carnitina, acilcarnitine, acidi nucleici, aminoacidi e altri

metaboliti. L'approccio "untargeted" per gli ECM è stato impiegato per caratterizzare l'acidemia metilmalonica e l'acidemia propionica (44). Si è scoperto che il profilo e l'identificazione simultanea di varie centinaia di metaboliti aumenta la probabilità di trovare nuovi composti associati a queste malattie, come ad esempio 5 ulteriori metaboliti dell'acetil-carnitina e la  $\gamma$ -butirro-betaina. Lo studio rappresenta una pietra miliare della metabolomica "untargeted", perché sostiene la tesi che questo approccio consente l'identificazione di nuovi biomarcatori in ECM noti (44). Più recentemente, 120 campioni di plasma prelevati da pazienti con diagnosi definitiva di ECM e 70 campioni prelevati da pazienti sottoposti a test diagnostici per ECM ma risultati negativi, sono stati analizzati usando un approccio "untargeted" replicato in parallelo su tre distinte piattaforme MS (GC-MS, LC-MS in modalità ione positivo e LC-MS in modalità ione negativo) (45). Basandosi sull'analisi dei cicli metabolici ("pathways analysis"), gli autori hanno individuato con successo 20 su 21 ECM; nel contempo, l'omocisteina, l'acido metilmalonico, la tetradecenoilcarnitina (C14:1) e il guanidinoacetato (GAA) non sono stati identificati. Questa limitazione è stata controbilanciata dall'identificazione di anomalie multiple di metaboliti associate a omocisteinuria e acidemia metilmalonica, confermando l'utilità di questo approccio per uno screening degli ECM quando il fenotipo del paziente è indifferenziato. Un approccio "untargeted" che ha combinato la spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  con la LC-MS/MS ha permesso di chiarire i difetti metabolici e la patogenesi della sindrome di Barth, una rara malattia causata da mutazioni del gene *TAZ*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq28), che dà origine al deficit di tafazzina, una proteina coinvolta nel rimodellamento della cardiolipina (46)<sup>2</sup>. Tutti i metaboliti identificati tramite MS hanno mostrato una chiara separazione tra i campioni di pazienti con la sindrome di Barth e i controlli. È interessante notare che, l'analisi di arricchimento ("pathway enrichment analysis") ha dimostrato l'associazione tra scompensi metabolici estesi, precedentemente sconosciuti, e l'eziologia della sindrome di Barth, rivelando nuovi potenziali target terapeutici. La metabolomica "untargeted" è stata applicata per studiare il metaboloma del plasma in 12 pazienti con deficit della catena lunga degli enzimi idrossi-acil-CoA deidrogenasi e palmitoiltransferasi 2 e il metaboloma in 11 controlli (47). In totale sono stati identificati 832 metaboliti. Quando i risultati sono stati analizzati seguendo il profilo metabolico di lipidi complessi (modello 2), l'analisi modellistica classificatoria multivariata supervisionata ("Partial Least Squares-Discriminant Analysis – PLS-DA") ha rivelato 117 variabili non-acetilcarnitina correlate, in grado di

<sup>2</sup>In assenza di tafazzina, una proteina estesamente studiata presso il Centro per le malattie ereditarie cardiovascolari del Policlinico S. Matteo di Pavia, si verificano anomalie che compromettono la funzione delle catene respiratorie e delle strutture mitocondriali, con un contenuto anomalo di cardiolipina e una riduzione della cardiolipina matura (NDT).

discriminare i controlli dai pazienti con alterazioni dell'ossidazione degli acidi grassi mitocondriali. Questa analisi permette di riconoscere il rischio e la gravità della malattia, nonché l'identificazione di sottotipi dei disturbi dell'ossidazione degli acidi grassi. Infine, la fenotipizzazione metabolica globale "untargeted" è stata testata con successo nel liquor di una coorte di pazienti pediatrici con diversi ECM (48). Oltre il 60% dei metaboliti individuati nel liquor era presente contemporaneamente nel sangue e nelle urine, suggerendo che un singolo campione di liquor analizzato mediante un piano di lavoro integrato di metabolomica può essere usato per identificare un ampio numero di composti biochimici utili per identificare alterazioni di vie metaboliche associate a ECM.

### Metabolomica applicata allo screening degli ECM

Il potenziale ruolo della metabolomica nello screening degli ECM è stato verificato per la prima volta in due ECM, la fenilchetonuria e la malattia delle urine a sciroppo d'acero (49). Per quest'ultima, caratterizzata da aumentati livelli di aminoacidi a catena ramificata, non c'era all'epoca nessuno screening disponibile. Campioni di sangue essiccati su cartoncino sono stati analizzati con la spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR. I risultati hanno dimostrato che la metabolomica è in grado di discriminare chiaramente non solo il metaboloma dei campioni dei bambini sani da quelli con la malattia delle urine allo sciroppo d'acero, ma è anche in grado di funzionare come test di screening metabolico specifico per questa malattia, discriminando inoltre la fenilchetonuria dalla malattia delle urine allo sciroppo d'acero (49). In uno studio eseguito su sei pazienti con sei distinti ECM (aciduria arginosuccinica, omocistinuria classica, acidemia metilmalonica classica, malattia delle urine allo sciroppo d'acero, fenilchetonuria e tirosinemia di tipo 2) e sei controlli, il metaboloma urinario è stato determinato associando la MS a ionizzazione per desorbimento (DESI-MS) con la spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR (50). Questa associazione ha permesso di discriminare il profilo metabolico urinario di ciascun paziente da quello degli altri pazienti e da quello dei controlli, proponendosi come un rapido e accurato screening urinario per una migliore caratterizzazione degli ECM. Con lo scopo di ridurre la quota di falsi positivi dello screening neonatale tradizionale MS/MS, un gruppo di ricercatori ha proposto un nuovo approccio basato sull'iniezione a flusso diretto, usando la sorgente di ionizzazione NanoSpray® in associazione con la MS ad alta risoluzione (51). L'analisi del profilo metabolico ha permesso l'identificazione selettiva di oltre 400 metaboliti, inclusi i lipidi complessi, gli acidi biliari, gli acidi organici, gli acidi grassi, i carboidrati e le acilcarnitine. Questa strategia ha consentito di riconoscere la galattosemia, individuando gli esosi e gli esosi fosfati, così come molte altre malattie che coinvolgono cambiamenti globali nel metaboloma. In un progetto di ricerca condotto nell'Italia meridionale tra il 2007 e il 2014 è stato valutato l'uso della metabolomica

"targeted" LC-MS/MS nello screening neonatale esteso per la diagnosi preclinica degli ECM (52). Lo studio era focalizzato sull'identificazione di neonati a rischio di morte in alcune malattie metaboliche, come i disordini di ossidazione degli acidi grassi, l'acidemia organica, la deficienza di aminoacidi a catena ramificata, l'iperammonemia e i disordini metabolici acquisiti dalla madre. I risultati hanno confermato il valore aggiunto dell'analisi metabolomica nel migliorare la previsione del rischio clinico grazie alla diagnosi pre-sintomatica degli ECM. Recentemente, una piattaforma qualitativa/quantitativa ad hoc MS ad alta risoluzione per le malattie metaboliche è stata sviluppata e convalidata, allo scopo di individuare e quantificare molte classi di metaboliti polari e non polari/idrofobici (53). Questa piattaforma è in grado di riconoscere un ampio numero di vari metaboliti, inclusi quelli misurati usando in parallelo metodi diversi tra loro. Uno studio multicentrico basato sulla spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR "targeted e untargeted" ha valutato la variabilità analitica su 20 metaboliti costantemente presenti nell'urina di neonati non affetti da patologie neonatali e su 45 metaboliti normalmente assenti nei neonati sani. Mediante l'approccio "targeted" è stata misurata la loro concentrazione e i risultati sono stati archiviati in un database di NMR (54). Il protocollo ha coinvolto 14 cliniche, con la raccolta di 989 campioni di urine di neonati di età compresa tra le 24 e le 168 ore dalla nascita. Quasi tutti i campioni (89,5%) sono stati misurati in doppio in due diversi laboratori. Gli spettri NMR dei neonati sani sono stati caratterizzati; i valori statisticamente anomali ("outliers") sono stati identificati, e gli spettri delle urine dei neonati malati sono stati acquisiti e conservati.

### Profilo metabolico urinario: vantaggi e insidie

L'urina è il liquido biologico ideale per gli studi di metabolomica in neonatologia: è sterile, facile da ottenere in quantità sufficiente e con metodi non invasivi. La caratterizzazione del metaboloma urinario contribuisce significativamente ad identificare l'impronta biochimica del metabolismo cellulare coinvolto in molti ECM (55). L'alta affidabilità dei campioni di urina per la metabolomica applicata alla diagnosi e al monitoraggio degli ECM è stata dimostrata in un recente studio effettuato in un campione di popolazione che racchiudeva 18 diversi ECM; 34 pazienti con diagnosi definitiva di ECM e 66 senza diagnosi definitiva (56). Lo studio ha identificato oltre 1200 metaboliti. Inoltre, sono state identificate inequivocabilmente le caratteristiche biochimiche di 16 ECM, mentre non sono state identificate correttamente due malattie: il deficit del trasportatore della creatina, causato da mutazioni del gene *SLC6A8* situato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq28), e il deficit di ornitina transcarbamilasi, uno dei sei errori congeniti del ciclo dell'urea causato da una mutazione del gene *OTC* espresso dagli epatociti e localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Xp21.1). Tuttavia, al momento dell'analisi i due pazienti affetti da

questi due ECM non identificati erano in trattamento terapeutico che potrebbe avere mascherato i biomarcatori specifici di malattia. Il profilo metabolico basato sulla GC-MS per lo screening neonatale degli ECM è stato esplorato in uno studio retrospettivo indiano eseguito su 23.140 campioni (57). Gli autori hanno dimostrato come il profilo metabolico urinario in GC-MS abbia migliorato significativamente l'efficacia dei programmi di screening neonatale in India, apparendo più completo per lo screening degli ECM, più facile e non invasivo. Oltre all'acidosi lattica primaria, all'acidemia organica e alle aminoacidopatie, la metabolomica GC-MS ha rivelato altri ECM come l'alcaptonuria, la malattia di Canavan e l'aciduria 4-idrossibutirrica. Sebbene molto vantaggiosa, soprattutto in età neonatale, l'analisi dell'urina può essere falsata dalla mancata o insufficiente standardizzazione della fase preanalitica. In particolare, la raccolta del campione e i protocolli di rimozione dell'urea sono passaggi cruciali per l'analisi GC-MS. Entrambi possono dare origine a potenziali interferenze negli studi metabolomici. La maggior parte dei metodi per la raccolta del campione di urina (mitto intermedio previo lavaggio, sacche di raccolta, cateteri soprapubici) non possono essere applicati in età neonatale; un metodo molto usato per la raccolta delle urine dei neonati sono i pannolini usa e getta. Tuttavia, dopo l'avvio della produzione e vendita di pannolini ultrasorbenti, è diventato pressoché impossibile raccogliere le urine direttamente dal pannolino. Per ovviare a questo problema, una pallina di cotone o un batuffolo di cotone sono stati inseriti nel pannolino usa e getta, e il cosiddetto "pannolino con batuffolo di cotone" è stato introdotto nella routine clinica (58). In tal modo, le urine sono assorbite dal cotone. Sfortunatamente, la tecnica "pannolino con batuffolo di cotone" potrebbe essere una fonte di contaminazione del campione. Uno studio sperimentale ha esaminato otto marche di pannolini, osservando che ognuno ha un profilo o una traccia contaminante univoca, che potrebbe potenzialmente interferire con i risultati ottenuti sia in  $^1\text{H}$  NMR che in LC-MS (59). Gli autori hanno concluso raccomandando la tipizzazione metabolica del "pannolino con batuffolo di cotone" prima di iniziare la valutazione del metaboloma urinario. Inoltre, hanno anche fortemente sconsigliato l'uso di varie marche di pannolini nell'ambito dello stesso studio metabolomico. Secondo questa raccomandazione, è possibile valutare se i profili dei contaminanti sono minimi e/o gestibili. Diversi altri fattori devono essere considerati con attenzione prima di analizzare i risultati, tra cui la temperatura, il pH, l'osmolalità, il periodo di contatto urina-pannolino prima della raccolta, la contaminazione batterica e il peso del bambino. Ognuno di questi fattori può influenzare significativamente l'entità della contaminazione del "pannolino con batuffolo di cotone" e le relative interferenze sul profilo metabolico urinario. Un'altra fase poco standardizzata è il pretrattamento dell'urina prima dell'analisi in GC-MS. Il pretrattamento del campione con ureasi ha lo scopo di rimuovere l'urea, presente in abbondanza nell'urina, perché può interferire

con la derivatizzazione chimica, causando una trasformazione chimica incompleta. La standardizzazione di questa fase consiste nel combinare in modo efficace il volume di enzima (ureasi) da aggiungere al campione con il tempo di trattamento del campione con ultrasuoni (sonicazione), evitando la rimozione incompleta dell'urea che, a sua volta, causa sovraccarico della colonna cromatografica, distorsioni nei picchi, rischio di co-eluzione dei metaboliti. Uno studio molto recente ha stabilito un protocollo standardizzato per la rimozione dell'urea, ottenendo la combinazione ottimale tra volume di ureasi e tempo di sonicazione (60).

## PROSPETTIVE FUTURE

Nonostante gli ECM siano disordini trasmessi geneticamente, tipicamente in maniera autosomica recessiva o recessiva legata al cromosoma X (per esempio la distrofia muscolare di Duchenne), il modello un gene, un enzima, una malattia non può più essere considerato valido. Infatti, il genoma non sempre può rivelare completamente la complessità degli ECM (61). D'altra parte, i metaboliti derivano da processi biologici intermedi che dipendono dalla genetica, dall'epigenetica, da fattori ambientali e dal fenotipo finale (62). Pertanto, il fenotipo metabolico fornisce informazioni su: nuove conoscenze sulle interazioni e meccanismi genetici, nuovi biomarcatori di diagnosi e prognosi e i meccanismi patogenetici delle malattie. La metabolomica offre l'opportunità di mappare i disordini delle vie metaboliche e il "network" dei metaboliti coinvolti nella patogenesi di una malattia metabolica (63,64). In realtà, il miglior approccio a studi metabolomici di ECM complessi potrebbe essere la combinazione tra un approccio "untargeted", che consente una visione d'insieme sulla vastità del metaboloma e l'analisi dei cicli metabolici, e un approccio "targeted", che permette la misura accurata di specifici metaboliti, determinandone anche e gli intervalli di riferimento. Questa strategia, adottata in vari studi (65-67), facilita l'identificazione di fenotipi e biomarcatori correlati ad una specifica malattia. L'integrazione dei dati di genomica con quelli di metabolomica rappresenta la sfida attuale per migliorare la diagnosi e la prognosi degli ECM. Il fine è identificare sia i loci metabolicamente attivi che i geni coinvolti nel modellare un fenotipo di malattia, migliorando le conoscenze specifiche sulla biologia di una malattia (68). Per esempio, la diagnosi definitiva della malattia delle urine a sciroppo d'acero dovrebbe essere basata almeno su: (a) identificazione o di varianti patogeniche DBT (codificante la subunità E2 della diidrolipoiltransacilasi), BCKDHB (codificante la subunità  $\beta$  decarbossilasi BCKA) o BCKDHA (codificante la subunità  $\alpha$  decarbossilasi BCKA); (b) misura di alti livelli di alloisoleucina, isoleucina, leucina, valina; (c) identificazione di 2 ossiacidi a catena ramificata (69). Nel cosiddetto "pathway-based approach", si possono studiare la penetranza delle mutazioni geniche e le anomalie metaboliche che delineano il fenotipo

biochimico dei pazienti (70). In conclusione, la metabolomica fa ormai parte di molti studi pubblicati sugli ECM (71). Nel contempo, molti laboratori clinici hanno introdotto la MS nella loro pratica routinaria negli ultimi 5 anni, rendendo più familiare questo metodo e riducendo di fatto gli ostacoli metodologici che finora hanno impedito di iniziare studi di metabolomica per espandere gli screening neonatali.

### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Garrod AE. Inborn errors of metabolism. In: June 1908: The Croonian Lectures Delivered Before The Royal College of Physician of London. London (UK): Oxford University Press, 1909.
- Gahl WA. Chemical individuality: Concept and outlook. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:630-40.
- Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, et al. Rare Disease Terminology and Definitions – A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health* 2015;18:906-14.
- Stanton BF. New Understanding of Mechanism and New Hope for Treatments. *Pediatr Clin North Am* 2018;65:xvii-xviii.
- Olby R. The Dimension of Scientific Controversy: The Biometric-Mendelian Debat. *Br J Hist Sci* 1989;22:299-320.
- Garrod AE. *Inborn Errors of Metabolism*. 2nd Edition. London (UK): Oxford University Press, 1923.
- Ferreira CR, van Karnebeek CDM, Vockley et al. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med* 2018 [Epub ahead of print].
- Zschocke J. SSIEM Classification of Inborn Errors of Metabolism. In Blau N, Duran M, Gibson KM, et al. Editors. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases*. Berlin Heidelberg (GE): Springer-Verlag, 2014:817-30.
- Saudbray JM, Garcia-Cazorla A. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management, *Pediatr Clin North Am* 2018;65:179-208.
- American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system – executive summary. *Pediatrics* 2006;117:S296-307.
- McHugh D, Cameron CA, Abdenur JE, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. *Genet Med* 2011;13:230-54.
- Hall PL, Marquardt G, McHugh DM, et al. Postanalytical tools improve performance of newborn screening by tandem mass spectrometry. *Genet Med* 2014;16:889-95.
- Marquardt G, Currier R, McHugh DM, et al. Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values. *Genet Med* 2012;14:648-55.
- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plan Mol Biol* 2002;48:155-71.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, et al. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 2012;491:384-92.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181-9.
- Lazar MA, Birnbaum MJ. Physiology. De-meaning of metabolism. *Science* 2012;336:1651-2.
- Scriver CR, Water PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-72.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16:373-8.
- Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 2016;12:148.
- Reymond JL, Ruddigkeit L, Blum I, et al. The enumeration of chemical space. *WIREs Comput Mol Sci* 2012;2:717-33.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2:2692-703.
- Markley JL, Bruschweiler R, Edison TM, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 2017;43:34-40.
- Gonzales-Dominguez R, Sayago A, Fernandez-Recamales A. Direct infusion mass spectrometry for metabolomic phenotyping of diseases. *Bioanalysis* 2017;9:131-48.
- Begou O, Gika HG, Wilson ID, et al. Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics. *Analyst* 2017;142:3079-100.
- Gonzales-Dominguez A, Duran-Guerrero F, Fernandez-Recamales A, et al. An Overview on the Importance of Combining Complementary Analytical Platforms In metabolomics REsearch. *Curr Top Med Chem* 2017;17:289-95.
- Rieberg E, Powers R. New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. *F1000Res* 2017;6:1148.
- Moolenaar SH, Engelke UF, Wevers RA. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem* 2003;40:16-24.
- Tebani A, Abily-Donval L, Alfons C, et al. Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *Int J Mol Sci* 2016;17(7).
- Sandlers Y. The future perspective: metabolomics in laboratory medicine for inborn errors of metabolism. *Transl Res* 2017;189:65-75.
- Shlomi T, Cabili MN, Ruppin E. Predicting metabolic biomarkers of human inborn errors of metabolism. *Mol Syst Biol* 2009;5:263.
- Wishtart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: The Human Metabolome Database. *Nucl Acids Res* 2007;35:D521-26.
- Mandal R, Chamot D, Wishtart DS. The role of the Human Metabolome Database in inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:329-36.
- Auray-Blais C, Boutin M. Novel gb(3) isoforms detected in urine of fabry disease patients: a metabolomic study. *Curr Med Chem* 2012;19:3241-52.
- Auray-Blais C, Boutin M, Gagnon R, et al. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal Chem* 2012;84:2745-53.
- Manwaring V, Boutin M, Auray-Blais C. A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients. *Anal Chem* 2013;85:9039-48.

37. Dupont FO, Gagnon R, Boutin M, et al. A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. *Curr Med Chem* 2013;20:280-8.
38. Boutin M, Auray-Blais C. Metabolomic discovery of novel urinary galabiosylceramide analogs as Fabry disease biomarkers. *J Am Soc Mass Spectrom* 2015;26:499-510.
39. Gertsman I, Barshop BA. Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:355-66.
40. Coene KLM, Kluijtmans LAJ, van der Heeft E, et al. Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:337-53.
41. Jacob M, Malkawi A, Albart N, et al. A targeted metabolomics approach for clinical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Chim Acta* 2018;1025:141-53.
42. Janeckova H, Hron K, Wojtowicz P, et al. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. *J Chromatogr A* 2012;1226:11-7.
43. Fan M, Sidhu R, Fujiwara H, et al. Identification of Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling. *J Lipid Res* 2013;54:2800-14.
44. Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, et al. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem* 2007;53:2169-76.
45. Miller MJ, Kennedy AD, Eckhart AD, et al. Untargeted metabolomic analysis for the clinical screening of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2015;38:1029-39.
46. Sandlers Y, Mercier K, Pathmasiri W, et al. Metabolomics reveals new mechanism for pathogenesis in Barth syndromes and introduces novel roles for cardiolipin in cellular function. *PLoS ONE* 2016;11:e0151802.
47. McCoin CS, Piccolo BD, Knotts TA, et al. Unique plasma metabolomic signatures of individuals with inherited disorders of long-chain fatty acid oxidation. *J Inherit Metab Dis* 2016;39:399-408.
48. Kennedy AD, Pappan KL, Donti TR, et al. Elucidation of the complex metabolic profile of cerebrospinal fluid using an untargeted biochemical profiling assay. *Mol Genet Metab* 2017;121:83-90.
49. Costantinou MA, Papakostantinou E, Benaki D, et al. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: a metabolomic approach. *Anal Chim Acta* 2004;511:303-12.
50. Pan Z, Gu H, Talaty N, et al. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:539-49.
51. Dénes J, Szabó E, Robinette SL, et al. Metabolomics of newborn screening dried blood spot samples: a novel approach in the screening and diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Chem* 2012;84:10113-20.
52. Scolamiero E, Cozzolino C, Albano L, et al. Targeted metabolomics in the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism. *Mol Biosyst* 2015;11:525-35.
53. Gertsman I, Gangoiti JA, Barshop BA. Validation of a dual LC-HRMS platform for clinical metabolic diagnosis in serum, bridging quantitative analysis and untargeted metabolomics. *Metabolomics* 2014;10:312-23.
54. Aygen S, Durr U, Hegele P, et al. NMR-Based Screening for Inborn Errors of Metabolism: initial Results from a Study on Turkish Neonates. *JIMD Rep* 2014;16:101-11.
55. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLoS ONE* 2013;8(9):e73076.
56. Kennedy AD, Miller MJ, Beebe K, et al. Metabolomic Profiling of Human Urine as a Screen for Multiple Inborn Errors of Metabolism. *Genet Test Mol Biomarkers* 2016;20:485-95.
57. Hampe MH, Panaskar SN, Yadav AA, et al. Gas chromatography/mass spectrometry-based urine metabolome study in children for inborn errors of metabolism: An Indian experience. *Clin Biochem* 2017;50:121-6.
58. Roberts SB, Lucas A. Measurements of urinary constituents and output using disposable napkins. *Arch Dis Child* 1985;60:1021-24.
59. Goodpaster AM, Ramadas EH, Kennedy MA. Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR and LC/MS based metabolomics studies of urine from newborn babies. *Anal Chem* 2011;83:896-902.
60. Palmas F, Mussap M, Fattuoni C. Urine metabolome analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): Standardization and optimization of protocols for urea removal and short-term sample storage. *Clin Chim Acta* 2018;485:236-42.
61. Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet* 2006;7:449-60.
62. Shin SY, Fauman EB, Petersen AK, et al. An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nat Genet* 2014;46:543-60.
63. Wangler MF, Hubert L, Donti TR, et al. A metabolomic map of Zellweger spectrum disorders reveals novel disease biomarkers. *Genet Med* 2018. [Epub ahead of print].
64. Tebani A, Afonso C, Marret S, et al. Omics-Based Strategies in Precision Medicine: Toward a Paradigm Shift in Inborn Errors of Metabolism Investigations. *Int J Mol Sci* 2016;17(9).
65. Dercksen M, Koekemoer G, duran M, et al. Organic acid profile of isovaleric acidemia: a comprehensive metabolomics approach. *Metabolomics*. 2013;9:765-77
66. Tebani A, Scmitz-Afonso I, Abily-Donval L, et al. Urinary metabolic phenotyping of mucopolysaccharidosis type I combining untargeted and targeted strategies with data modeling. *Clin Chim Acta* 2017;475:7-14
67. Sahoo S, Franzson L, Jonsson JJ, et al. A compendium of inborn errors of metabolism mapped onto the human metabolic network. *Mol Biosyst* 2012;8:2545-58
68. Graham E, Lee J, Price M, et al. Integration of genomics and metabolomics for prioritization of rare disease variants: a 2018 literature review. *Inherit Metab Dis* 2018 [Epub ahead of print]
69. Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. editors. *Maple syrup urine disease*. *Gene Reviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2013:93-7
70. Guo L, Milburn MV, Ryals JA, et al. Plasma metabolomic profiles enhance precision medicine for volunteers of normal health. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:E4901-10
71. Piras D, Locci E, Palmas F, et al. Rare disease: a focus on metabolomics. *Exp Opin Orphan Dis* 2016;4:1229-37

## La biologia molecolare clinica nella valutazione e prevenzione del rischio cardiologico nell'attività sportiva e nell'attività motoria intensa

Cristina Mazzaccara<sup>1,2</sup>, Valeria D'Argenio<sup>1,2</sup>, Marcella Nunziato<sup>1,2</sup>, Maria Valeria Esposito<sup>1,2</sup>, Francesco Salvatore<sup>1,2</sup>, Giulia Frisso<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via G. Salvatore 486, Napoli

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Sergio Pansini 5, Napoli

### ABSTRACT

**Clinical molecular biology in the assessment and prevention of cardiological risk in case of participation in sports activity and intense physical activity.** We review the clinical molecular biology approach for the prevention of cardiological diseases, essentially via risk assessment at personal level by DNA analysis. Intense physical activity, particularly during athletic performances, can result in syncope or even cardiac arrest, often followed by sudden cardiac death. An approach to the prevention of such tragic events is predictive medicine (presence of pathogenic mutations in cardiac genes), besides the conventional tools used in cardiology (mainly electro and echocardiogram under stress conditions). Accordingly, we list the major cardiac diseases and their related genes and derivative proteins which are instrumental for normal heart function. Alterations can occur in ion channel genes, in genes encoding desmosomal and junctional proteins, sarcomeric and Z-disc proteins, proteins for the cytoskeleton at the nuclear envelope, and in genes encoding mitochondrial proteins. Thus, we constructed two sets of gene panels: one set to discriminate among confounding heart diseases, and another set based on a cost-benefit criterion according to the most or less frequent genes bearing pathogenic variants that entail a higher or lower predisposing risk. This approach should be used to monitor pre-participation athletes and also amateurs who belong to families in which at least 1-2 subjects are affected by cardiac alterations. The risk should be identified with the aim to monitor subjects in order to prevent cardiac arrest and even sudden cardiac death.

### IMPORTANZA DELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO CARDIOLOGICO NELL'AVVIAMENTO ALLO SPORT

La pratica dell'attività sportiva ha indubbiamente un effetto benefico sullo stato di salute generale e concorre a prevenire disturbi cronici, tra cui le malattie cardiovascolari (1). Negli ultimi 50 anni, molti studi hanno dimostrato una riduzione dello sviluppo di malattie coronariche in soggetti praticanti attività sportiva (2-4), nonché una riduzione della mortalità totale e di quella cardiovascolare in pazienti cardiopatici sottoposti ad adeguati programmi di allenamento (5,6).

Negli ultimi decenni è, però, anche chiaramente emerso come nell'atleta l'attività fisica possa slatentizzare la presenza di un rischio genetico per una cardiopatia clinicamente occulta (7). L'esperienza

accumulata in più di 30 anni di studio sugli atleti della regione Veneto ha dimostrato che la combinazione fra una cardiopatia latente e lo sforzo fisico scatena, in alcuni casi, un evento aritmico, che può provocare anche la morte improvvisa (8). Infatti, negli atleti portatori di mutazione associata ad una cardiopatia genetica, l'esercizio fisico intenso può produrre alterazioni cardiovascolari sempre più rilevanti, che possono esordire anche con la morte cardiaca improvvisa (SCD) (9,10).

Secondo la più recente definizione dell' *European Society of Cardiology* (ESC), la morte improvvisa è definita come "evento fatale non traumatico, inatteso, che avviene entro un'ora dall'inizio della sintomatologia in un soggetto in apparente buona salute". La definizione cardiaca si aggiunge qualora sia nota la presenza di una patologia cardiaca, congenita o acquisita,

Corrispondenza a: Francesco Salvatore, CEINGE-Biotecnologie Avanzate e Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Via Pansini 5, 80131, Napoli. Tel. 0817463133, Fax 0817463650; mobile: 335/6069177; e-mail salvator@unina.it

Ricevuto: 22.10.2018

Revisionato: 8.01.2019

Accettato: 18.01.2019

Pubblicato on-line: 04.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.006

potenzialmente fatale, oppure se l'esame autoptico evidenzia un'anomalia cardiaca o vascolare come probabile causa dell'evento, o quando l'esame *post-mortem* non evidenzia alcuna possibile causa extracardiaca (11). Molto spesso la morte improvvisa negli atleti avviene durante la competizione sportiva o immediatamente dopo; talvolta, può presentarsi anche a riposo o durante il sonno (12-15).

Sebbene la SCD correlata alla pratica dell'attività sportiva sia un evento raro, studi recenti riportano che essa rappresenta circa il 5% delle SCD totali (16,17), a loro volta stimate all'incirca in 300.000 per anno nell'area geografica dell'Europa/America settentrionale (14,15,18,19). Pertanto, si reputa che circa 15.000 SCD/anno avvengano durante la pratica dell'attività sportiva o subito dopo, corrispondenti a circa 1/50.000 atleti/anno (20). Si ritiene che gli atleti maschi siano colpiti più spesso delle femmine (8,10), e che siano a maggior rischio gli atleti afro-americani, i giocatori di basket e di football americano negli Stati Uniti, e i calciatori in Europa (20,21). Rispetto a queste stime è, però, necessario anche distinguere tra atleti competitivi e soggetti praticanti attività sportive amatoriali. Sebbene i mezzi di informazione catalizzino maggiormente l'attenzione verso i giovani atleti competitivi, che incarnano il prototipo del benessere fisico, il fenomeno della SCD correlata allo sport coinvolge soprattutto i soggetti che praticano attività sportive amatoriali (22). Infatti, solo il 6% delle SCD correlate allo sport si manifesta in giovani atleti competitivi, rispetto al 94% delle morti che avviene, invece, nell'ambito ludico-ricreativo (22).

La prevenzione della SCD negli atleti asintomatici, inconsapevolmente affetti da malattie cardiache, rappresenta un importante obiettivo che coinvolge numerosi ambiti della professione medica e del sistema sanitario in generale. In questo contesto, il laboratorio di biologia molecolare clinica ha acquisito un ruolo sempre più rilevante per l'identificazione precoce delle alterazioni molecolari che possono essere causative o concausative di SCD negli atleti. Infatti, non solo è importante individuare lo specifico difetto del DNA associato ad una cardiopatia clinicamente manifesta in un atleta, che verosimilmente non ne era consapevole, ma soprattutto riconoscere l'eventuale predisposizione individuale a sviluppare una patologia cardiaca latente, prima che la malattia possa manifestarsi con l'evento fatale di SCD (23).

Pertanto, lo scopo di questa rassegna è discutere i recenti progressi nella biologia molecolare clinica delle malattie cardiache ereditarie, quali le cardiomiopatie e le canalopatie, più comunemente associate ad aumentato rischio di SCD nei soggetti praticanti attività sportiva, dopo aver discusso la fisiopatologia molecolare e cellulare delle proteine del muscolo cardiaco.

## PATOLOGIE CARDIACHE DA IDENTIFICARE PRECOCEMENTE NEGLI SPORTIVI

Le patologie cardiache geneticamente determinate e talvolta potenzialmente letali nei giovani atleti (età inferiore a 35 anni) sono patologie del muscolo cardiaco che determinano anomalie miocardiche strutturali e/o funzionali, in assenza di malattia coronarica, ipertensione, patologie valvolari, incluse quelle da disordini elettrici (24). Le patologie cardiache, da un punto di vista morfo-funzionale, possono essere suddivise in quattro principali categorie, che, in ordine decrescente di coinvolgimento nella SCD, secondo quanto riportato nelle più recenti casistiche (20,25-33), sono rappresentate da:

- i disturbi elettrici primari, noti anche come canalopatie cardiache (in assenza di cardiomiopatia strutturale), quali, ad esempio la sindrome del QT lungo (LQTS), la sindrome di Brugada (BrS) e la tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT);
- la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC), attualmente meglio definita come cardiomiopatia aritmogena (AC);
- la cardiomiopatia ipertrofica (HCM);
- la cardiomiopatia dilatativa (DCM).

Fino a pochi anni fa, l'AC era considerata la causa più frequente di SCD negli sportivi in Italia (e nei paesi del mediterraneo), mentre la HCM era riportata come la causa più frequente nei paesi anglo-americani, essendo diagnosticate, rispettivamente, in circa il 20% e nel 40% dei casi (8,10,27,34). L'azione di prevenzione cardiologica iniziata nel 1982 attraverso lo screening, svolto principalmente in Italia, aveva determinato una minore adesione allo sport e all'attività motoria intensa per giovani con HCM e pertanto si era verificata una diminuzione di morti dovuti a HCM ereditaria, negli sportivi. Di conseguenza, altre cardiopatie, prima fra tutte l'AC, hanno rappresentato la principale causa di SCD negli atleti in Italia rispetto alle popolazioni anglofone (27). Tuttavia, dati più recenti mettono in dubbio questa differente eziologia tra gli atleti dell'area mediterranea e quelli anglo-americani. Infatti, l'analisi delle cause di SCD negli atleti della *National Collegiate Athletic Association* (USA), basata sulla valutazione dei reperti autoptici nel periodo compreso tra il 2003 e il 2013, ha evidenziato che nella maggior parte dei casi (25%) il cuore dell'atleta morto improvvisamente non presenta alcuna apparente anomalia strutturale; infatti, il reperto istologico di HCM o di AC è identificabile rispettivamente nell'8% e nel 5% delle autopsie (29). Risultati simili sono stati riportati in differenti analisi retrospettive effettuate anche in numerosi paesi europei (Italia, Regno Unito e Danimarca) (29-33). Le discrepanze rispetto ai dati forniti in passato sulle cause di morte improvvisa sono verosimilmente attribuibili all'eterogeneità delle frequenze relative nei vari paesi e delle procedure diagnostiche ed autoptiche utilizzate e hanno indotto l'ESC a promuovere linee guida

internazionali per la definizione di protocolli standard in caso di SCD (11). Un importante contributo all'autopsia tradizionale è rappresentato dalla cosiddetta autopsia molecolare, ossia l'analisi genetica *post-mortem* attraverso moderne tecniche di biologia molecolare (35). In questo modo è stato possibile identificare le canalopatie cardiache come la principale causa di SCD in presenza del reperto autoptico di un cuore apparentemente sano sia nell'atleta (36) sia nella popolazione generale (37).

Le cardiopatie associabili alla SCD dell'atleta (canalopatie, AC, HCM, DCM idiopatica) riconoscono una causa familiare e/o un'alterazione a livello del DNA. La maggior parte di esse sono trasmesse con carattere autosomico dominante, sebbene alcune forme presentino un'ereditarietà autosomica recessiva e/o legata al cromosoma X o matrilineare. L'eterogeneità genetica è un fenomeno comune a tutte le cardiopatie, per cui uno stesso fenotipo può essere associato a mutazioni in geni diversi; per esempio, la HCM è attribuibile a più di 100 geni differenti (24). E' anche presente, però, il fenomeno dell'eterogeneità allelica, per cui mutazioni diverse nello stesso gene possono causare malattie differenti; per esempio, le mutazioni del gene *SCN5A* possono provocare LQTS, BrS, HCM o DCM idiopatica (38).

L'espressività variabile e la penetranza incompleta (precoce o tardiva) sono altresì terminologie e caratteristiche ricorrenti di queste patologie; differenti membri della stessa famiglia, pur essendo portatori della stessa mutazione, mostrano quadri clinici diversificati anche se della stessa patologia (39). Pertanto, una certa quota di individui, pur avendo il genotipo-malattia, non manifesta il fenotipo corrispondente (40). Numerose evidenze suggeriscono che l'eterogeneità delle manifestazioni fenotipiche possa essere correlata alla presenza di mutazioni in altri geni, che funzionano da geni modificatori, o ad altri fattori scatenanti come l'età (per cui il fenotipo non si manifesta negli individui più giovani) o anche stimoli ambientali, tra cui la stessa attività fisica (41).

Sulla base di queste osservazioni è nata la necessità di descrivere e classificare le cardiopatie mediante l'integrazione del fenotipo morfo-funzionale con le informazioni molecolari, in modo da contribuire alla stratificazione del rischio, raccomandazioni scientificamente valide ai soggetti che si avviano all'attività sportiva, nonché ai soggetti che già praticano uno sport e alle loro famiglie. La ricerca di specifiche alterazioni del DNA, infatti, consente sia di chiarire la possibile causa di anomalie subcliniche messe in evidenza dai test cardiovascolari non invasivi (elettro e ecocardiogramma, risonanza magnetica nucleare), sia di estendere l'indagine molecolare ai familiari dei pazienti in cui è stata individuata una mutazione patogenetica del DNA, consentendo di identificare gli individui a rischio in fase pre-clinica o asintomatica.

Da queste considerazioni, nel 2013 è nata, e poi successivamente perfezionata, la classificazione

MOGE(S) (24,42,43), che classifica le cardiomiopatie mediante cinque specifici elementi distintivi: le caratteristiche morfo-funzionali (M), il coinvolgimento di organi e tessuti (O), il modello di ereditarietà genetica (G), l'eziologia (E) con i dettagli della mutazione patogenetica, ove presente, a cui può essere aggiunto lo status funzionale (S), valutato utilizzando lo stadio ACC-AHA dell'American College of Cardiology-American Heart Association (ACC-AHA) (stadio A, B, C e D) e le classi della New York Heart Association (classi NYHA I-II-III-IV).

## BASI MOLECOLARI DELLE PATOLOGIE CARDIACHE

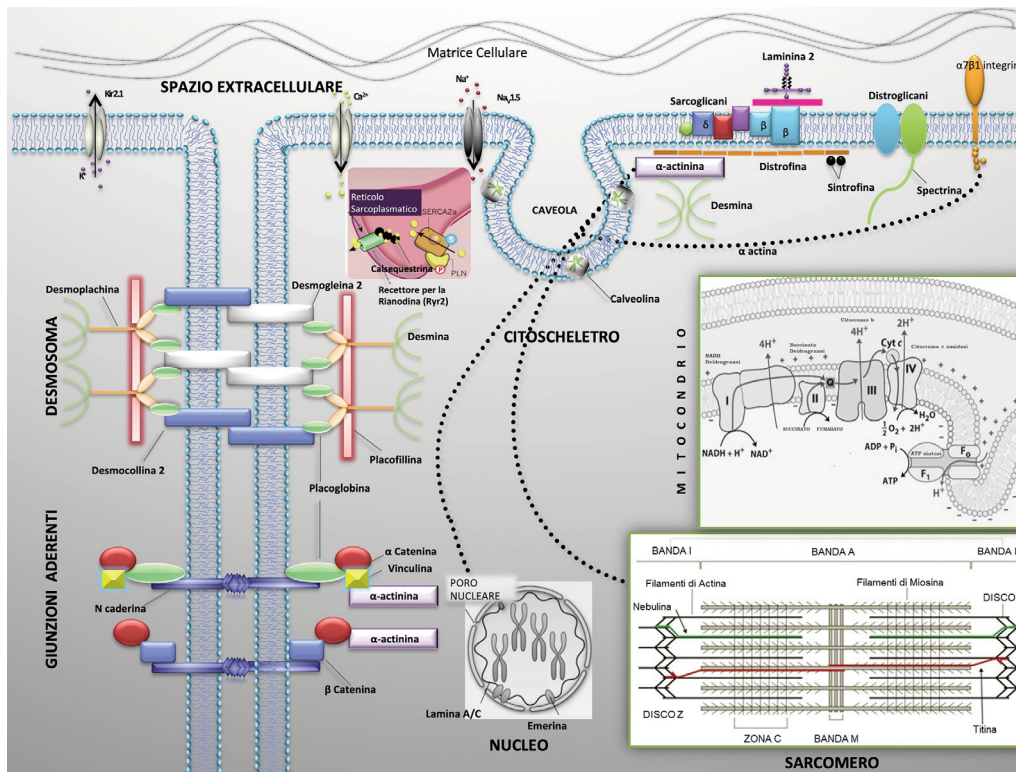
La conoscenza delle basi molecolari a livello genico dei vari tipi di cardiopatie è progressivamente aumentata negli ultimi decenni. Le analisi di *linkage*, gli studi di associazione *genome-wide* ed il sequenziamento dell'intero esoma hanno contribuito in maniera esponenziale all'identificazione dei geni-malattia, che ora include oltre 200 geni, benché esistano ancora diverse lacune, più o meno significative (44-54). Per esempio, nella BrS, pur utilizzando metodiche molecolari ad elevata sensibilità diagnostica, in circa o più della metà dei casi non si è riusciti ad identificare un'alterazione molecolare causativa; mentre i test attualmente disponibili per la HCM o per la LQTS raggiungono una sensibilità diagnostica rispettivamente di circa il 70% e il 90%.

Nei paragrafi successivi vengono descritte le basi molecolari delle cardiopatie genetiche raggruppate anche in base al compartimento cellulare dove risulta presente la proteina alterata nel cardiomiocita (Figura 1).

## Alterazioni dei canali ionici e delle loro proteine regolatrici

Le mutazioni nei geni codificanti i canali ionici cardiaci danno origine ad uno spettro di patologie definite canalopatie cardiache, che si configurano essenzialmente come disturbi elettrici primari, predisponenti alla SCD in assenza di una cardiopatia strutturale (55). L'eziologia delle canalopatie cardiache è stata anche correlata alla presenza di mutazioni in geni codificanti per proteine che regolano l'espressione, il trasporto e la localizzazione cellulare dei canali ionici cardiaci (56) (Figura 1 e Tabella 1).

La sostituzione anche di un singolo nucleotide in uno di tali geni può produrre significative alterazioni funzionali nel comportamento elettrofisiologico del canale, interferendo nelle varie fasi del potenziale d'azione cardiaco o nel traffico di ioni, generando instabilità elettrica, disturbi del ritmo cardiaco di tipo bradicardico o tachicardico e aritmie potenzialmente anche letali. Le manifestazioni cliniche sono riconducibili a tale vulnerabilità elettrica e sono rappresentate da sincopi, convulsioni, fino ad arresto cardiaco e anche SCD, indotte eventualmente dall'esercizio fisico intenso,



**Figura 1**  
**Disegno schematico di parti di cardiomiocita.**

In esso sono indicate altresì le principali componenti (sarcomero, canali ionici, desmosoma, giunzioni aderenti, citoscheletro, involucro nucleare, mitocondrio) nonché alcune principali proteine coinvolte nella eziopatogenesi delle cardiomiopatie genetiche.

in assenza di una cardiopatia già sintomatica. Le anomalie elettrocardiografiche possono avere nulla o tardiva penetranza ed espressività, rendendo le indagini clinico-strumentali spesso anche del tutto silenti e pertanto inefficaci a fini diagnostici (55). Tuttavia, poiché la SCD può essere il sintomo di esordio della malattia, la prevenzione e di qui la predittività diventano essenziali. La diagnostica molecolare a livello genico è utile in queste circostanze, in quanto consente di pervenire a diagnosi definitiva e di identificare i soggetti a rischio di SCD (57). Diverse patologie rientrano nel gruppo delle canalopatie cardiache su base genetica, di cui tre sono quelle relativamente più frequenti: la LQTS, la CPVT e la BrS. A queste vanno aggiunte diverse sindromi aritmogeniche ereditarie rare, quali la sindrome del QT corto (SQTS), la malattia del nodo del seno (SSS), il difetto familiare progressivo della conduzione cardiaca e la sindrome di Haïssaguerre o sindrome di ripolarizzazione precoce (52-54).

Circa 40 geni sono stati associati a tali patologie. L'epidemiologia molecolare di queste sindromi evidenzia molto bene il fenomeno dell'eterogeneità genetica. La BrS, ad esempio, si caratterizza per un'eterogeneità genetica molto elevata. Il gene SCN5A, che codifica la sub-unità  $\alpha$  del canale cardiaco del sodio, presenta mutazioni causative nel 20-25% dei pazienti affetti da BrS. In aggiunta, sono stati descritti almeno altri 30 geni

associati a tale aritmia primitiva, di cui 4 (CACNA1C, SCN10A, CACNB2b, ABCC9) sono responsabili ciascuno di poco più del 5% dei genotipi positivi, mentre tutti gli altri sono molto rari (58). Nel caso della LQTS, 3 geni (KCNQ1, KCNH2, SCN5A) spiegano insieme fino al 75% dei casi clinicamente definiti; i rimanenti geni ad oggi noti contribuiscono, complessivamente, a un ulteriore 5% (59-61). La CPVT presenta un substrato genetico più omogeneo; infatti, un solo gene (RYR2) risulta mutato in circa il 60% dei pazienti e solo una piccola percentuale di pazienti presenta mutazioni in altri geni (62-64).

È importante ricordare che, come effetto dell'eterogeneità allelica tipica delle cardiopatie ereditarie, mutazioni nel gene SCN5A sono state associate non solo a BrS e a LQTS ma anche ad altre aritmie primitive, come la malattia del nodo del seno, il difetto familiare progressivo della conduzione cardiaca, o cardiomiopatie strutturali (65).

Tipicamente, i geni coinvolti nella genesi delle canalopatie cardiache codificano per le sub-unità  $\alpha$  o  $\beta$  dei canali voltaggio-dipendenti del sodio (NaV1.5) o del potassio (Kv7.1 e Kv11.1); per il canale del potassio attivato da proteine G (GIRK4); il canale rettificante entrante Kir2, il canale del calcio di tipo L (CaV1.2), il canale del calcio localizzato nei tubuli T, noto anche come recettore cardiaco della diidropiridina. Le

mutazioni nei geni codificanti questi canali possono essere di tipo *loss* o *gain of function*, benché siano descritte anche mutazioni che hanno effetti misti sulla complessa funzione dei canali cardiaci (66,67). In linea generale, le mutazioni che provocano acquisizione di funzione del canale del sodio o del calcio, così come quelle che producono perdita di funzione dei canali del potassio, determinano un incremento della durata del potenziale d'azione cardiaco, con prolungamento della ripolarizzazione del cardiomiocita e allungamento del tratto QT. Queste alterazioni sono, pertanto, compatibili con la LQTS. Le mutazioni del canale NaV1.5 che comportano una riduzione dell'ampiezza della corrente del sodio si associano, invece, a BrS. Infine, la CPVT è, generalmente, causata da mutazioni *gain of function* nel gene *RYR2*, codificante il canale per il rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico, che svolge una funzione cruciale nella regolazione delle concentrazioni di calcio intracellulare.

Nell'ultimo decennio è diventato sempre più evidente che le sindromi aritmiche ereditarie possano essere associate anche a mutazioni nei geni codificanti per proteine associate ai canali ionici cardiaci o per i loro trasportatori intracellulari che, con meccanismi differenti, possono influenzare l'attività del canale stesso. Per esempio, le mutazioni nei geni che codificano per proteine regolanti l'omeostasi intracellulare del calcio, come le calmoduline o la calsequestrina, possono associarsi a LQTS o CPVT (68,69), mentre le mutazioni nel gene della caveolina, una proteina *scaffold* della membrana delle caveole dei cardiomiociti, possono influenzare sia la corrente del sodio (70) che la corrente *pacemaker* (71). Inoltre, mutazioni nel gene che codifica per la proteina A-kinase anchor protein 9 (*AKAP9*) sono state associate alla LQTS; tale proteina, infatti, è un membro della famiglia delle proteine ancoranti la proteina chinasi A, ed è coinvolta nella regolazione della funzione di almeno tre canali ionici cardiaci, tra cui il canale del potassio Kv7.1, il recettore cardiaco della rianodina ed il canale cardiaco del calcio di tipo L (72,73). Allo stesso modo, infine, sono state associate a LQTS anche mutazioni nel gene della sintrofina (*SNTA1*), una proteina citoscheletrica che interagisce con il C terminale del canale NaV1.5 (56,74).

Il traffico intracellulare dei canali ionici cardiaci può essere perturbato da mutazioni delle anchirine: per esempio, l'anchirina G è associata al canale NaV1.5 e lo indirizza ai dischi intercalari. L'anchirina B, invece, è direttamente associata con lo scambiatore Na/Ca, l'ATPasi Na/K e il recettore dell'inositolo 3-fosfato. Mutazioni nell'anchirina G e nell'anchirina B sono state associate, rispettivamente, a BrS (75), LQTS (76) e CPVT (64). Infine, alterazioni in una serie di proteine regolatrici della funzione del canale del sodio NaV1.5, come ad esempio l'enzima glicerolo-3-fosfato deidrogenasi 1-simile o la proteina nucleare RAN, che scambia i nucleotidi guanilici, sono state associate a BrS (77).

E' importante segnalare che alterazioni nei geni codificanti per canali ionici del sodio e del potassio sono

state riscontrate anche in pazienti con cardiopatie strutturali quali DCM, HCM o la cardiomiopatia del ventricolo sinistro non compatto (LVNC) (38,78,79). Sebbene si tratti di situazioni molto rare, alcuni studi riportano che mutazioni del gene *SCN5A* possono essere osservate con una prevalenza fino al 2,6% dei pazienti DCM analizzati (78). Finora non è stato ancora chiarito il meccanismo mediante cui le mutazioni di un canale ionico possano provocare difetti strutturali ed emodinamici; in particolare, nel caso della DCM potrebbe essere molto importante la connessione esistente tra il canale del sodio e le proteine citoscheletriche (80,81).

### Alterazioni dei dischi intercalari: le proteine desmosomiali e le giunzioni aderenti

Il disco intercalare è un complesso intercellulare altamente organizzato che garantisce l'integrità strutturale e la sincronizzazione funzionale del miocardio (Figura 1). L'adesione intercellulare è garantita da due strutture giunzionali principali, i desmosomi e le giunzioni aderenti, che formano una zona funzionale ibrida nota come area composita (82).

Il desmosoma (Figura 1) è una giunzione di natura proteica localizzata nei tessuti sottoposti a stress meccanico, come l'epidermide ed il miocardio. Da un punto di vista funzionale, infatti, il desmosoma è responsabile della giunzione tra i filamenti intermedi dei citoscheletri di cellule adiacenti, in modo da conferire al tessuto resistenza alla trazione ed ai traumi fisici (83,84). Esso, inoltre, regola la trascrizione di geni coinvolti nell'adipogenesi e nell'apoptosi e mantiene una corretta conduttività elettrica attraverso la regolazione delle giunzioni comunicanti e dell'omeostasi del calcio. I desmosomi cardiaci si legano ai filamenti intermedi mediante le desmoplachine, proteine citoplasmatiche che legano direttamente i filamenti intermedi, e alcune proteine armadillo, le placoglobine e le placofilline, che fanno da ponte tra la desmoplachina e le caderine. Queste ultime, in particolare la desmogleina e la desmocollina, sporgono dalla membrana plasmatica verso la matrice extracellulare e, entrando in mutuo contatto con le strutture omologhe adiacenti, garantiscono così il legame tra cellule adiacenti.

La principale cardiopatia associata ad alterazioni in geni codificanti le proteine desmosomiali (Tabella 1) è rappresentata dalla cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC), che attualmente si preferisce indicare con il nome più onnicomprensivo di cardiomiopatia aritmogena (AC), dal momento che, sebbene il ventricolo destro sia più frequentemente interessato, nelle fasi avanzate della patologia la degenerazione del miocardio può estendersi anche al ventricolo sinistro. L'AC è caratterizzata da una sostituzione, parziale o massiva, del tessuto miocardico con tessuto adiposo o fibro-adiposo, determinando un'instabilità elettrica che può innescare una fibrillazione ventricolare (85). L'incidenza di SCD nei pazienti affetti da AC è stimata tra lo 0,08% e il 3,6% per anno (86);

studi più recenti, tuttavia, hanno riportato una mortalità annuale <1% nei pazienti con genotipo noto (87), sottolineando il ruolo dell'indagine molecolare nella prevenzione della SCD.

Mutazioni nei geni codificanti le proteine desmosomiali sono state identificate in circa il 50-60% dei pazienti affetti da AC (88-90). In particolare, il gene maggiormente coinvolto è *PKP2*, che codifica per la placofillina ed è responsabile di circa il 30-40% dei casi (91). E' importante sottolineare che la placofillina è localizzata non solo nella placca interna dei desmosomi, ma anche nel nucleo dove può innescare la proliferazione adiposa tipica dei cuori AC, mediante inibizione della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina (92).

Mutazioni nei geni desmosomiali sono state descritte anche come causa di DCM, con una prevalenza di circa il 5%, suggerendo che, almeno in alcuni casi, la

distinzione tra le due patologie non sia così netta (93).

Recentemente, l'AC è stata associata anche a mutazioni dell' $\alpha$ T-Catenina e della N-caderina (94,95). A livello cardiaco, queste proteine si localizzano nelle giunzioni aderenti del disco intercalare ancorandosi, a livello intracellulare, ai microfilamenti di actina del citoscheletro e promuovendo l'adesione cellula-cellula attraverso associazioni extracellulari dei domini ripetuti della N-caderina. Pertanto, è stato recentemente proposto che l'AC sia considerata una patologia dell'area composita dei dischi intercalari, piuttosto che una malattia esclusiva del desmosoma.

#### Tabella 1

Descrizione dei principali geni e delle relative proteine con possibili patologie cui vengono associate. Sono altresì indicate ulteriori informazioni utili per comprendere le caratteristiche delle proteine e la loro localizzazione.

Gene	Locusgenetico (OMIM ID)	Localizzazione cromosomica	Trascritto ID ENSEMBL	Lunghezza trascritto (bp)	Nome e funzione delle proteine	Patologia associata
<i>A: GENI CODIFICANTI PROTEINE DEI CANALI IONICI e loro PROTEINE REGOLATRICI</i>						
ABCC9	601439	12p12.1	ENST00000261200.8	8293	Canale del potassio ATP sensibili	BrS, DCM
AKAP9	604001	7q21.2	ENST00000356239.7	12471	Proteina di ancoraggio alla PKA 9	LQTS
ANK2	106410	4q25-q26	ENST00000357077.8	14196	Anchirina 2	LQTS
CACNA1C	114205	12p13.33	ENST00000399655.5	13433	Subunità $\alpha$ 1C del canale del calcio CaV1.2	BrS
CACNA2D1	114204	7q21.11	ENST00000356860.7	7563	Subunità $\delta$ del canale del calcio CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1	BrS
CACNB2b	611876	10p12.33	ENST00000396576.6	4464	Subunità $\beta$ del canale del calcio CaV $\beta$ 2b	BrS
CALM1	114180	14q32.11	ENST00000356978.8	4242	Calmodulina 1	CPVT
CALM2	114182	2p21	ENST00000272298.11	1302	Calmodulina 2	LQTS
CASQ2	114251	1p13.1	ENST00000261448.5	2674	Calsequestrina 2	CPVT, HCM, DCM
CAV3	601253	3p25.3	ENST00000343849.2	1431	Caveolina 3	LQTS, HCM, DCM
GPD1L	611777	3p22.3	ENST00000282541.9	4060	Glicerolo-3-fosfato deidrogenasi 1-simile	BrS
HCN4	613123	15q24.1	ENST00000261917.3	7228	Canale 4 attivato dall'iperpolarizzazione e nucleotide ciclico-controllato	BrS
KCND2	605410	7q31.31	ENST00000331113.8	5331	Subunità $\alpha$ del canale del potassio Kv4.2	BrS
KCND3	616399	1p13.2	ENST00000315987.6	2716	subunità $\alpha$ del canale del potassio Kv4.3	BrS

**Tabella 1**  
*Continua*

Gene	Locusgenetico (OMIM ID)	Localizzazione cromosomica	Trascritto ID ENSEMBL	Lunghezza trascritto (bp)	Nome e funzione delle proteine	Patologia associata
KCNE1	176261	21q22.11	ENST00000337385.7	3347	Subunità $\beta$ di canali del potassio voltaggio dipendenti (sottofamiglia E subunità regolatoria 1) MINK	LQTS
KCNE2	603796	21q22.11	ENST00000290310.3	1051	Subunità $\beta$ di canali del potassio voltaggio dipendenti (sottofamiglia E subunità regolatoria 2) MIRP1	LQTS
KCNE3	613119	11q13.4	ENST00000310128.8	3143	Subunità $\beta$ di canali del potassio voltaggio-dipendenti (sottofamiglia E subunità regolatoria 3) MIRP2	BrS
KCNE5	300328	Xq23	ENST00000372101.3	1473	Subunità $\beta$ di canali del potassio voltaggio-dipendenti (sottofamiglia E subunità regolatoria 5)	BrS
KCNH2	152427	7q36.1	ENST00000262186.9	4286	Subunità $\alpha$ del canale del potassio hERG/Kv11.1	BrS,LQTS
KCNJ2	600681	17q24.3	ENST00000243457.3	5392	Canale del potassio rettificante entrante Kir2.)	CPVT,LQTS
KCNJ5	600734	11q24.3	ENST00000529694.5	5940	Canale del potassio rettificante entrante GIRK4	LQTS
KCNJ8	600935	12p12.1	ENST00000240662.2	2389	Subunità $\alpha$ del canale del potassio Kir6.1	BrS
KCNQ1	607542	11p15.5	ENST00000155840.9	3245	Subunità $\alpha$ del canale del potassio voltaggio-dipendente Kv7.1	DCM, LQTS
RYR2	180902	1q43	ENST00000366574.6	16562	Recettore della rianodina 2	HCM,DCM, CA, LQTS, CPVT
SCN10A	604427	3p22.2	ENST00000449082.2	6418	Subunità $\alpha$ del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV1.8	BrS
SCN1B	612838	19q13.12	ENST00000415950.4	4537	Subunità $\beta$ del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV $\beta$ 1	BrS,LQTS
SCN2B	601327	11q23.3	ENST00000278947.5	5826	Subunità $\beta$ del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV $\beta$ 2	BrS
SCN3B	613120	11q24.1	ENST00000392770.6	6061	Subunità $\beta$ del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV $\beta$ 3	BrS
SCN4A	603967	17q23.3	ENST00000435607.3	7805	Subunità $\alpha$ 4 del canale del sodio voltaggio-dipendente	BrS
SCN4B	608256	11q23.3	ENST00000324727.8	4484	Subunità $\beta$ 4 del canale del sodio voltaggio-dipendente	LQTS
SCN5A	600163	3p22.2	ENST00000413689.5	8504	Subunità $\alpha$ del canale del sodio voltaggio-dipendente NaV1.5	DCM,BrS, LQTS

**Tabella 1**  
*Continua*

Gene	Locusgenetico (OMIM ID)	Localizzazione cromosomica	Trascritto ID ENSEMBL	Lunghezza trascritto (bp)	Nome e funzione delle proteine	Patologia associata
<b>B: GENI CODIFICANTI PROTEINE DEI DISCHI INTERCALARI (desmosomi e giunzioni aderenti)</b>						
CADH2	114020	18q12.1	ENST00000269141.7	4332	N-Caderina	CA
CTNNA3	607667	10q22.2	ENST00000433211.6	10675	Catenina $\alpha$ 3	CA
DSC2	125645	18q12.1	ENST00000280904.10	12325	Desmocollina 2	CA,DCM
DSG2	125671	18q12.1	ENST00000261590.12	5831	Desmogleina 2	CA,DCM
DSP	125647	6p24	ENST00000379802.7	9796	Desmoplachina	CA,DCM
JUP	173325	17q21	ENST00000393931.7	3497	Placoglobina	CA,DCM
PKP2	602861	12p11	ENST00000340811.8	4302	Placofilina 2	CA,DCM, BrS
<b>C: GENI CODIFICANTI PROTEINE SARCOMERICHE e del DISCO Z</b>						
ACTC1	102540	15q14	ENST00000290378.4	4106	Alfa actina cardiaca	HCM,DCM
ACTN2	102573	1q43	ENST00000546208.5	5103	$\alpha$ -actinina 2	HCM,DCM
LDB3	605906	10q23.2	ENST00000429277.6	5436	Proteina legante il dominio LIM 3	HCM,DCM
MYBPC3	600958	11p11.2	ENST00000545968.5	4226	Proteina C legante la miosina cardiaca	HCM,DCM
MYH6	160710	14q11.2	ENST00000405093.7	5941	Catena pesante dell'alfa miosina 6	HCM,DCM
MYH7	160760	14q11.2	ENST00000355349.3	6087	Catena pesante della beta miosina 7	HCM, DCM
MYL2	160781	12q24.11	ENST00000228841.12	807	Catena leggera della miosina 2	HCM,DCM
MYL3	160790	3p21.31	ENST00000292327.4	924	Catena leggera della miosina 3	HCM
MYPN	608517	10q21.3	ENST00000613327.4	6116	Miopalladina	HCM,DCM
NEBL	605491	10p12.31	ENST00000377122.8	9216	Nebulina muscolo cardiaco (nebulette)	DCM
NEXN	613121	1p31.1	ENST00000330010.12	3195	Nexilina	HCM,DCM
TCAP	604488	17q12	ENST00000309889.2	2123	Teletonina	HCM,DCM
TNNC1	191040	3p21.1	ENST00000232975.7	714	Troponina C cardiaca	HCM,DCM
TNNI3	191044	19q13.42	ENST00000344887.9	840	Troponina I3 cardiaca	HCM,DCM
TNNT2	191045	1q32.1	ENST00000509001.5	1330	Troponina T2 cardiaca	HCM,DCM
TPM1	191010	15q22.2	ENST00000358278.7	1717	Tropomiosina 1	HCM,DCM

**Tabella 1**  
*Continua*

Gene	Locusgenetico (OMIM ID)	Localizzazione cromosomica	Trascritto ID ENSEMBL	Lunghezza trascritto (bp)	Nome e funzione delle proteine	Patologia associata
TTN	188840	2q31.2	ENST00000589042.5	109224	Titina	HCM,DCM, CA
VCL	193065	10q22.2	ENST00000372755.7	6489	Vinculina	HCM,DCM
<b>D: GENI CODIFICANTI PROTEINE DEL CITOSCHELETRO e DELLA MEMBRANA NUCLEARE</b>						
DES	125660	2q35	ENST00000373960.3	2248	Desmina	HCM, DCM, CA
DMD	300377	Xp21.2	ENST00000357033.8	13956	Distrofina	DCM
DTNA	601239	18q12.1	ENST00000283365.13	6522	$\alpha$ -distrobrevina	DCM
EMD	300384	Xq28	ENST00000369842.8	1379	Emerina	DCM
LAMA2	156225	6q22.33	ENST00000421865.2	9640	Laminina $\alpha$ 2	DCM
LAMA4	600133	6q21	ENST00000230538.11	6547	Laminina $\alpha$ 4	DCM
LMNA	150330	1q22	ENST00000368300.8	3190	Lamina A/C	DCM,CA
PLN	172405	6q22.31	ENST00000232975.7	714	Fosfolambano	CA,DCM
SGCD	601411	5q33.2	ENST00000435422.7	9755	Delta-sarcoglicano	DCM
SNTA1	601017	20q11.21	ENST00000217381.2	2342	$\alpha$ -Sintrofina	LQTS
SYNE1	608441	6q25.2	ENST00000367255.9	27748	Nesprina 1	DCM
<b>E: GENI CODIFICANTI PROTEINE MITOCONDRIALI (GENOMA MITOCONDRIALE E NUCLEARE)</b>						
MTCO2	516040	7586-8269	ENST00000361739.1	227	Citocromo C ossidasi, subunità 2	HCM
MTCO3	516050	9207-9990	ENST00000362079.2	261	Citocromo C ossidasi, subunità 3	HCM
MTRNR1	561000	70-1024	ENST00000082388.1	955	12S rRNA	HCM
MTRNR2	561010	1671-3229	ENST00000387347.2	1559	16S rRNA	HCM
MTTK	590060	8295-8364	ENST00000387421.1	70	tRNALys	HCM,DCM
MTTL1	590050	3230-3304	ENST00000386347.1	75	tRNA <sup>Leu</sup> (UUR)	HCM,DCM
SURF2	185620	9q34.2	ENST00000371974.7	256	proteina Surf	HCM
SCO2	604272	22q13.3	ENST00000543927.5	266	Proteina assemblaggio Citocromo C ossidasi	HCM
MRPL3	607118	3q22.1	ENST00000264995	332	Proteina ribosomiale L3	HCM
MRPL44	611849	2q36.1	ENST00000258383	348	Proteina ribosomiale L44	HCM

*BrS, Sindrome di Brugada; DCM, Cardiomiopatia Dilatativa; LQTS, Sindrome del QT lungo; CPVT, Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica; HCM, Cardiomiopatia Ipertrofica; CA, Cardiomiopatia Aritmogena;*

### Alterazioni del sarcomero e del disco Z

Il sarcomero è la principale unità strutturale e funzionale del cardiomiocita; è costituito essenzialmente da 8 proteine, organizzate in filamenti sottili e filamenti spessi, ed è delimitato ad entrambe le estremità dai dischi Z, strutture composte da proteine di ancoraggio per i filamenti sottili (Figura 1). I filamenti spessi sono costituiti dalla catena pesante e dalle due catene leggere della miosina, nonché dalla proteina C legante la miosina. I filamenti sottili includono l'actina e le proteine regolatrici, rappresentate dalla tropomiosina e dal complesso delle tre troponine. L'interazione tra queste proteine ed il loro corretto funzionamento rappresentano un presupposto indispensabile per la normale contrazione del sarcomero e, pertanto, del muscolo cardiaco.

Mutazioni nei geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *ACTC1*, *TPM1*, *MYL2* e *MYL3*, codificanti le otto proteine sarcomeriche, sono responsabili di almeno il 60-70% dei casi di HCM. In particolare, sono frequentemente coinvolti i geni *MYBPC3* (codificante la proteina C legante la miosina, ~30-40%) e *MYH7* (codificante la miosina, ~20-30%), mentre sono meno frequenti le alterazioni a carico dei sei geni rimanenti, che complessivamente si riscontrano in meno del 10% dei casi di HCM (Tabella 1) (46,80,96). La maggior parte delle mutazioni nei geni dei miofilamenti sarcomerici sono mutazioni di tipo missenso, ossia caratterizzate dalla sostituzione di un singolo amminoacido. Tuttavia, nel caso del gene *MYBPC3*, sono comuni anche piccole inserzioni o delezioni nucleotidiche che, producendo lo scivolamento (*frameshift*) della cornice di lettura, inseriscono nell'mRNA un codone di stop prematuro che può determinare la degradazione precoce dell'mRNA mutato o l'arresto della sintesi proteica, con sintesi di una proteina tronca che viene velocemente degradata (97). Pertanto, i meccanismi attraverso cui le mutazioni nei geni dei miofilamenti alterano la struttura e la funzione del sarcomero sono molteplici e possono comprendere l'aploinsufficienza (ridotta quantità di proteine funzionali) e la sintesi di una proteina mutata che interferisce con la normale funzione proteica. Circa il 5% dei pazienti affetti da HCM presenta mutazioni multiple a carico dei geni sarcomerici; in questi casi si osservano in genere manifestazioni cliniche più severe e con esordio precoce (96,98). Complessivamente, la presenza di mutazioni a carico dei geni codificanti le proteine dei miofilamenti determina l'interruzione dell'integrità strutturale dell'apparato sarcomerico; ne consegue un'alterazione della produzione della forza e/o della trasmissione dei segnali biomeccanici, che determina l'insorgenza dell'ipertrofia cardiaca. È importante, tuttavia, ricordare che mutazioni nei geni del sarcomero sono state riscontrate anche in circa il 5-10% dei casi di DCM (99-104).

Più raramente, la compromissione dei meccanismi di trasduzione dello stimolo meccanico in segnali elettrici e biochimici è causata da mutazioni in geni codificanti per le numerose proteine del disco Z, quali titina,

miopalladina, nebullette, obscurina, actinina e teletonina. Il disco Z è una complessa struttura proteica localizzata ad entrambe le estremità di ciascun sarcomero e connessa, direttamente ed indirettamente, ai miofilamenti sarcomerici. Le cardiopatie associate ad alterazioni di questa placca proteica sono denominate Z-discopatie e sono caratterizzate da una grande variabilità fenotipica (105). Infatti, sono state descritte sia mutazioni che aumentano il legame del sarcomero al disco Z che, rendendo il sarcomero rigido, determinano più probabilmente ipertrofia miocardica, sia mutazioni che indeboliscono il legame tra questi elementi e, generando un sarcomero lasso, si associano a DCM, CA o miocardio non compatto (105).

I geni codificanti le proteine del disco Z sono mutati raramente nella HCM (<1% ciascuno) e più frequentemente nella DCM. In particolare, mutazioni nel gene *TTN*, codificante la titina, sono presenti nel 25% delle forme familiari e nel 18% delle forme sporadiche (o apparentemente tali) di DCM (104). Infine, è importante sottolineare che mutazioni della titina sono state associate anche ad AC, generando un fenotipo caratterizzato da aritmie sopraventricolari e disturbi della conduzione (106-108).

### Alterazioni del citoscheletro e della membrana nucleare

Il citoscheletro miocardico è composto da proteine che costituiscono un supporto strutturale intracellulare e che sono capaci di trasmettere la forza meccanica, generata nel sarcomero, alla matrice extracellulare (109) (Figura 1).

Numerosi geni che codificano per le proteine del citoscheletro sono stati associati a cardiopatie, quali DCM e AC (Tabella 1). In particolare, mutazioni nei geni codificanti per le proteine distrofina, desmina, distroglicano, distrobrevina, sarcoglicano, sintrofina, fosfolambano e caveolina (*DMD*, *DES*, *DAG1*, *DTNA*, *SGCD*, *SNTA1*, *PLN* e *CAV3*) interferiscono con la trasduzione meccanica all'interno dell'apparato contrattile del miocardio, determinando così una diminuzione della produzione di forza del cardiomiocita e, quindi, la compromissione della funzione sistolica (110). Inoltre, alcune proteine del citoscheletro si legano ai canali ionici e ne modulano l'attività, simulando così i fenomeni aritmici causati dalle mutazioni proprie di questi canali (111). Studi di regolazione dei canali ionici, infatti, hanno evidenziato la formazione di macrocomplessi proteici tra proteine strutturali, come la distrofina, la sintrofina e la caveolina-3, ed i canali ionici come NaV1.5 (111) e il canale del calcio di tipo L (CaV1.2) (112) già citati in precedenza nel paragrafo "Alterazioni dei canali ionici e delle loro proteine regolatrici". Infine, mutazioni nel gene della desmina, una proteina che collega i desmosomi con il disco Z contribuendo a legare fra loro le miofibrille, definiscono le cosiddette desminopatie, un gruppo clinicamente eterogeneo di miopatie scheletriche associate raramente a cardiomiopatia restrittiva (109), DCM o AC (108,113).

La membrana nucleare rappresenta un altro comparto del cardiomiocita che può essere alterato in presenza di cardiopatie e soprattutto in presenza di DCM. La principale componente proteica della membrana nucleare è la lamina A/C, un filamento intermedio nucleare che polimerizza in modo da formare un reticolo fibroso localizzato sulla superficie nucleoplasmatica della membrana nucleare interna. La lamina A/C fa parte del complesso *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton* (LINK), che collega il citoscheletro citoplasmatico con la lamina nucleare. Fanno parte di questo complesso proteico anche l'emierina e le nesprine 1 e 2.

Mutazioni nei geni che codificano per le proteine dell'involucro nucleare (*LMNA*, *EMD*, *SYNE-1*, *SYNE2* e *SUN1/2*) sono state associate ad una gamma di disordini ereditari che possono interessare differenti tessuti, tra cui il muscolo cardiaco (114). Il fenotipo cardiaco più frequentemente associato a tali mutazioni è rappresentato dalla DCM, benché siano state descritte mutazioni delle proteine dell'involucro nucleare anche associate a cardiomiopatia restrittiva e all'AC (115-118). In questi casi, la sovrapposizione del fenotipo clinico, in particolare tra l'AC e la DCM può essere significativa. Di particolare interesse sono, infine, le mutazioni nel gene *TMEM43*, che codifica per una proteina della membrana interna nucleare e che contenendo un elemento responsivo per PPAR $\gamma$ , può regolare il differenziamento adipogenico (119). Sebbene molto rare, le mutazioni in *TMEM43* sono caratterizzate da un'elevata penetranza ed associate a fenotipi di AC estremamente severi e con un'alta incidenza di SCD (88,120,121).

### Alterazioni in geni codificanti per proteine mitocondriali (genoma mitocondriale e nucleare)

La cardiopatia è una manifestazione frequente anche in molte malattie mitocondriali (MDs). Le MDs rappresentano un gruppo eterogeneo di sindromi cliniche (prevalenza: 5-12/100.000) accomunate da un deficit energetico del metabolismo mitocondriale (122-124). Le MDs sono prevalentemente patologie multisistemiche, ma anche organo-specifiche, che interessano principalmente tessuti ad alta richiesta energetica, quali il muscolo cardiaco, il muscolo scheletrico, il sistema nervoso e la retina (123). A causa del duplice controllo genetico, mitocondriale e nucleare, le MDs possono essere causate sia da mutazioni nel genoma mitocondriale (mt-DNA) e quindi a trasmissione matrilineare, sia da alterazioni in geni nucleari (125). In entrambi i casi, il sistema della fosforilazione ossidativa risulta direttamente o indirettamente compromesso e caratterizzato da un deficit energetico conseguente alla diminuzione della produzione di ATP (126,127). In particolare, le alterazioni nei geni (mitocondriali o nucleari) codificanti per le proteine della catena respiratoria determinano una riduzione della funzione enzimatica in uno o più complessi della catena stessa, mentre le mutazioni nei RNA mitocondriali (mt-tRNA)

possono alterare la traduzione mitocondriale, diminuendo la disponibilità di mt-tRNA funzionanti (128,129). Le mutazioni nei geni coinvolti nel mantenimento e nella maturazione del mt-DNA, così come nella stabilità e nell'assemblaggio dei complessi della catena respiratoria sono, invece, esclusivamente di origine nucleare (Tabella 1).

Le MDs sono caratterizzate da un'elevata variabilità fenotipica, dovuta alla differente origine genetica (nucleare o mitocondriale), alla presenza di eteroplasmia (coesistenza di molecole di mt-DNA normale e mutato all'interno di un mitocondrio) ed al cosiddetto effetto soglia. Per effetto soglia si intende il rapporto tra la quantità di mt-DNA mutato ed il mt-DNA totale necessario affinché si manifesti il fenotipo; tale valore è differente nei vari tessuti ed è inversamente proporzionale al fabbisogno energetico del tessuto interessato. A livello cardiaco la soglia è relativamente bassa, pertanto una compromissione della funzione cardiaca è molto frequente nelle MDs. In particolare, la cardiopatia mitocondriale può manifestarsi sia nell'ambito di sindromi complesse: *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes* (MELAS), *Myoclonus Epilepsy with Ragged-Red Fibers* (MERF), *Maternally inherited Diabetes and Deafness* (MIDD), sindrome di Leigh (LS), sindrome di Kearns-Sayre (KSS) (130), sia come fenocopia di altre cardiopatie, come la HCM, la DCM, la cardiomiopatia restrittiva o anche le sindromi aritmiche (96,131-133). Il fenotipo ipertrofico dovuto a deficit mitocondriale (circa il 40% dei casi di MDs) è causato da proliferazione intermiofibrillare dei mitocondri con conseguente danno meccanico e deficit della funzione sarcomerica (134,135). Seppur raramente, la SCD può essere associata ad una cardiopatia mitocondriale a causa del ruolo chiave svolto dai mitocondri nella produzione di energia e nella regolazione dei meccanismi bioenergetici cardiaci (Figura 1) (131) (136). In particolare, la mutazione mt.3243A>G, tRNA<sup>Leu</sup>, è stata associata a SCD sia in bambini che in adulti asintomatici e senza evidenza strumentale indicativa di una patologia cardiaca (137).

Mutazioni a carico di geni mitocondriali che sono state associate alla presenza di una cardiopatia mitocondriale, sia isolata che nell'ambito di una malattia multiorgano, sono state descritte nei geni *MTCO2* e *MTCO3* che codificano per proteine del complesso IV della catena di trasporto mitocondriale; *SURF1* e *SCO2*, che codificano per fattori di assemblaggio dello stesso complesso (133); *MTTK* e *MTTL1*, responsabili della sintesi dei tRNA mitocondriali (130); *MT-RNR2* e *MRPL3* e *MRPL44*, codificanti, rispettivamente, l'rRNA 16S e le proteine ribosomiali mitocondriali (133).

L'eterogeneità dell'espressione clinica può ritardare il corretto inquadramento diagnostico e richiede un approccio multidisciplinare integrato, con una particolare attenzione all'anamnesi familiare e ad alcune comorbidità, quali l'ipoacusia neurosensoriale, il diabete ed i deficit visivi, che possono suggerire l'origine mitocondriale della cardiomiopatia (138).

## L'IMPORTANZA DELLE NUOVE TECNOLOGIE PER LA DIAGNOSI DI PRECISIONE

Come discusso nelle precedenti sezioni, numerose patologie cardiache dovute ad alterazioni molecolari note come patogenetiche, o supposte tali con buona probabilità induttiva, si associano ad un maggiore rischio di SCD. Pertanto, la loro presenza deve essere accuratamente valutata nell'ambito della prevenzione cardiologica cui sono sottoposti tutti i soggetti che intraprendono attività sportive, con particolare riguardo a coloro che presentano familiarità all'indagine anamnestica che deve essere particolarmente accurata.

Attualmente, l'analisi molecolare per l'identificazione di alterazioni del DNA responsabili di cardiopatie ereditarie (soprattutto cardiomiopatie e canalopatie) non viene di norma effettuata negli atleti, ma dovrebbe essere indicata almeno in presenza di una storia familiare positiva per cardiopatia sicuramente non secondaria, e/o di un sospetto clinico dovuto alla presenza di segni o sintomi suggestivi (episodi di sincope, aritmie, arresto cardiaco, segni strumentali molto suggestivi di possibile alterazione cardiaca) (139).

Anche in presenza di elementi indicativi di una cardiopatia ereditaria, il corretto inquadramento diagnostico di tali patologie è spesso molto complesso. Abbiamo già sottolineato come le cardiopatie ereditarie siano un gruppo di patologie cardiache caratterizzate da un'elevata eterogeneità clinica e genetica (40). In aggiunta a ciò, molti dei geni associati a cardiopatie ereditarie sono di grandi dimensioni e costituiti da un elevato numero di esoni (vedi ad esempio il gene della titina, costituito da 363 esoni). Tutti questi fattori contribuiscono a rendere estremamente complessa la diagnosi molecolare delle cardiopatie ereditarie, specialmente mediante tecniche tradizionali come il sequenziamento di Sanger. Infatti, il sequenziamento con metodo di Sanger dei geni maggiormente associati ad una specifica patologia, in base al sospetto clinico e/o agli esiti di indagini strumentali, non solo richiede lunghi tempi di esecuzione ma spesso comporta una minore sensibilità diagnostica, legata anche ad una minore sensibilità analitica. Questi limiti sono stati superati dallo sviluppo di tecniche di sequenziamento degli acidi nucleici ad elevata produttività (*Next Generation Sequencing*, NGS) (140).

Le tecniche di NGS, a partire dalla loro disponibilità commerciale circa dieci anni fa, hanno avuto uno sviluppo esponenziale che ha modificato diversi aspetti della ricerca biomedica, inclusa soprattutto la diagnostica molecolare (141). Tali metodiche, infatti, consentono l'analisi di un elevato numero di nucleotidi, in maniera accurata e a costi estremamente competitivi rispetto ai metodi tradizionali. Ne consegue che, negli ultimi anni, diversi approcci basati su metodi di NGS sono stati sviluppati e validati al fine di sviluppare nuovi protocolli sensibili ed accurati, da implementare nella diagnostica molecolare di base, e di studiare i meccanismi eziopatogenetici coinvolti nello sviluppo di una malattia (o di gruppi di patologie), al fine di

identificare nuovi biomarcatori diagnostici, prognostici e/o terapeutici (141). Il grande valore aggiunto delle metodiche di NGS è rappresentato dalla loro versatilità. Queste tecnologie permettono, infatti, l'analisi di interi genomi (da piccoli genomi procariotici fino all'intero genoma umano) (142-145) o di regioni genomiche di interesse che possono avere dimensioni variabili da un singolo gene o esone (146-148), fino all'analisi di pannelli di geni più o meno ampi (149-151), o dell'intero esoma (152-154).

L'analisi di pannelli di geni, in particolare, si sta rivelando una strategia di elezione per lo studio di patologie caratterizzate da fenotipi clinici confondenti e da basi molecolari estremamente eterogenee, come le cardiopatie su base genetica. Questo tipo di approccio, infatti, non solo permette di analizzare un elevato numero di geni contemporaneamente in più pazienti, ottimizzando i tempi dell'indagine molecolare ed aumentando la sensibilità diagnostica dell'analisi molecolare, ma, attraverso l'identificazione di ulteriori varianti associate al fenotipo-malattia, permette di ottenere informazioni anche su possibili fattori genetici aggiuntivi che possono agire come modificatori del fenotipo o essere predittivi della prognosi dei pazienti (155-159).

## Tecnologie di sequenziamento genico ad elevata produttività

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi approcci per lo studio di specifiche regioni del DNA sfruttando le potenzialità delle tecniche di NGS per identificare, in maniera rapida ed accurata, variazioni di sequenza associate a specifiche patologie (141). In particolare, sistemi denominati "di cattura" per l'arricchimento selettivo dei geni di interesse a partire dal DNA genomico, si sono dimostrati un approccio particolarmente efficiente per lo studio di tante patologie ad eziologia multigenica, in cui l'analisi di un pannello di geni rappresenta sicuramente un valore aggiunto per una diagnosi molecolare sensibile ed anche differenziale tra patologie clinicamente confondenti (141,160).

Questo tipo di metodica si basa su reazioni di ibridazione per l'arricchimento selettivo delle regioni genomiche selezionate mediante l'impiego di specifiche sonde di cattura disegnate *ad hoc* (161-163). In particolare, il DNA genomico di ciascun campione da analizzare è frammentato mediante sonicazione o attraverso l'uso di specifici enzimi. La possibilità di marcare in maniera univoca, con specifiche sequenze *barcode*, i frammenti relativi a differenti campioni di DNA consente l'analisi simultanea degli stessi in un'unica procedura, con ulteriore ottimizzazione dei tempi e della complessiva produttività analitica. Una volta verificata la qualità della frammentazione, i frammenti di DNA ottenuti vengono ibridizzati in fase liquida con le specifiche sonde di cattura biotinilate (162). Al termine dell'ibridazione, i frammenti di DNA legati alle sonde sono arricchiti utilizzando biglie marcate con streptavidina, in modo da ottenere una libreria per

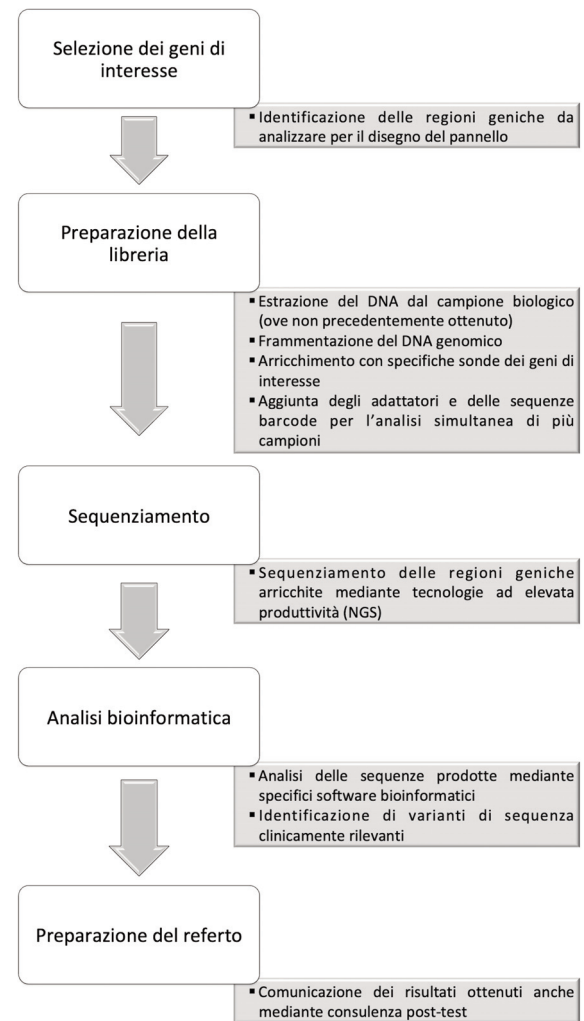
ciascun campione che può essere sequenziata mediante le piattaforme di NGS (163,164) (Figura 2).

Ad oggi, questa metodologia è stata utilizzata per identificare varianti geniche associate a numerose malattie differenti e/o predittive della risposta ad una specifica terapia (149-151). Inoltre, l'analisi simultanea di numerosi geni è uno strumento utile per lo studio di famiglie in cui la corretta correlazione genotipo/fenotipo è cruciale per l'identificazione dei soggetti a rischio (155-159) anche per la presenza di più geni alterati e per la valutazione delle eventuali alterazioni di maggiore patogenicità.

È importante sottolineare che, come per altre tipologie di protocolli, anche nel caso di metodologie di arricchimento selettivo, l'analisi dei dati di sequenza prodotti dalle piattaforme di NGS rappresenta un punto fondamentale e critico per la corretta identificazione, nell'ambito della grande mole di dati prodotti, delle sole informazioni clinicamente rilevanti. Infatti, l'enorme e rapido progresso tecnologico che ha caratterizzato le tecnologie di NGS ha permesso di aumentare in maniera esponenziale la produttività dei sequenziatori, in termini di basi sequenziate per seduta analitica. Ciò ha spostato l'attenzione sulla necessità di disporre di strumenti adeguati per la gestione e l'analisi dei dati prodotti. Ne consegue che diverse aziende stanno proponendo strumenti informatici specifici e validati per scopi di diagnostica molecolare che permettano l'analisi delle sequenze prodotte dalle piattaforme di NGS anche a personale di laboratorio non in possesso di una specifica ed elevata formazione bioinformatica. Certamente, diverse questioni legate alla gestione dei cosiddetti risultati non attesi (*incidental findings*) o delle varianti di significato incerto, unitamente a problematiche legate alla *privacy* dei dati, stanno animando e animeranno il dibattito della comunità scientifica e necessitano di linee guida più precise, sia per regolamentare tale settore, ma anche per consentire di non menomare l'efficienza diagnostica dei dati ottenuti (165,166,80).

### Analisi di pannelli di geni negli sportivi

L'analisi di pannelli di geni mediante sequenziamento NGS rappresenta l'approccio analitico ideale per l'identificazione di mutazioni del DNA associate a patologie geneticamente e clinicamente eterogenee, come le cardiopatie, in particolare quelle familiari ed ereditarie. Diversi studi scientifici, infatti, hanno dimostrato come l'implementazione di pannelli di geni nella pratica clinica sia in grado di aumentare la sensibilità diagnostica dell'analisi molecolare (146,148,57) supportando i cardiologi nella gestione del paziente e dei familiari attraverso l'identificazione dei soggetti a rischio (80, 143,167-169). Dal momento che le cardiopatie ereditarie rappresentano una causa di morbilità e mortalità con rischio più elevato nei soggetti che praticano attività sportiva, l'impiego di tale metodologia analitica è da prendere come un'utile implementazione nell'ambito del percorso di



**Figura 2**  
**Tecniche di sequenziamento genico ad elevata produttività per l'analisi di pannelli di geni.**

*Il protocollo descritto nel flusso di lavoro della figura prevede, una volta identificati i geni di interesse da includere nel pannello, la preparazione di librerie di DNA attraverso arricchimento in soluzione utilizzando sonde biotinilate. Il sequenziamento delle librerie produce una grande quantità di dati che richiedono specifici software di analisi per identificare le varianti clinicamente rilevanti; è ovvio che in molti casi le varianti sono già classificate in relazione alla loro patogenicità mentre in altri casi si deve anche procedere ad una accurata correlazione genotipo-fenotipo nella famiglia, nonché - ove possibile - in dimostrazioni sperimentali in vitro per conoscere l'eventuale funzione alterata.*

prevenzione cardiologica per gli atleti e per l'avvio all'attività sportiva e all'attività motoria intensa anche nel dilettantismo. Alcune recenti evidenze supportano l'importanza di un'analisi molecolare accurata anche negli sportivi al fine di identificare precocemente o prevenire gravi complicanze, fino al rischio di morte improvvisa (139,170,171).

In questo contesto, D'Argenio et al., hanno recentemente descritto il caso di un giovane atleta in cui

l'analisi di un pannello di geni ha permesso di identificare una mutazione associata alla BrS, dimostrando l'utilità dell'indagine molecolare anche in soggetti asintomatici (57).

Considerate le implicazioni collegate all'esito dell'esame, le problematiche legate ai limiti dell'analisi molecolare nonché alle difficoltà di interpretazione dei risultati richiedono una grande cautela per prevenire da un lato mancate idoneità non necessarie e, dall'altro importanti e gravi conseguenze fino al tragico evento della morte improvvisa (139,170,171).

### Sequenziamento del DNA di terza generazione

Più di recente, nuove metodologie di sequenziamento genico, dette di terza generazione, sono state sviluppate allo scopo di superare alcuni limiti legati alla produzione di sequenze corte, tipiche dei sequenziatori di seconda generazione o NGS (172). I sequenziatori di terza generazione più diffusi sono principalmente di due tipi: Pacific Biosystems (PacBio) che utilizza un tipo di sequenziamento *Single Molecule Real-Time* (SMRT) (173), e *Oxford Nanopore Techniques* (ONT) che ha sviluppato un dispositivo per il sequenziamento basato sul passaggio del DNA attraverso nanostrutture, i nanopori (174). Questo tipo di approccio, è in grado di identificare singole molecole di DNA, proteine e piccole molecole grazie alla loro capacità di attraversare un nanoporo senza la necessità di effettuare delle reazioni di sintesi enzimatica. Più nel dettaglio, la piattaforma è composta da singoli nanopori incorporati su una singola cella a flusso. Un potenziale elettrico spinge il DNA verso e poi dentro i nanopori. Quando una singola molecola viene catturata e passa attraverso il poro crea delle perturbazioni della corrente dei nanopori che vengono identificate da una rete neurale artificiale (*Recurrent Neural Network*) che le converte in sequenze di basi (175). A differenza delle tecniche di seconda generazione, questi metodi non includono la fase di amplificazione durante la preparazione delle librerie di sequenziamento consentendo, quindi, il sequenziamento di singole molecole e, soprattutto, evitando i possibili errori di sequenza legati alla *polymerase chain reaction* (PCR) (176). Inoltre, questi approcci permettono di ridurre fortemente sia i tempi di preparazione delle librerie che i tempi di sequenziamento, incrementando, invece, la lunghezza delle sequenze prodotte, molto più elevata rispetto a quelle delle tecniche di seconda generazione con una media di oltre 10 kilo-base pairs (kbp), fino a 54 kbp per l'approccio della *Single Molecule Real-Time* e da circa 6 kbp fino a 150 kbp utilizzando la tecnica dei nanopori (177-180).

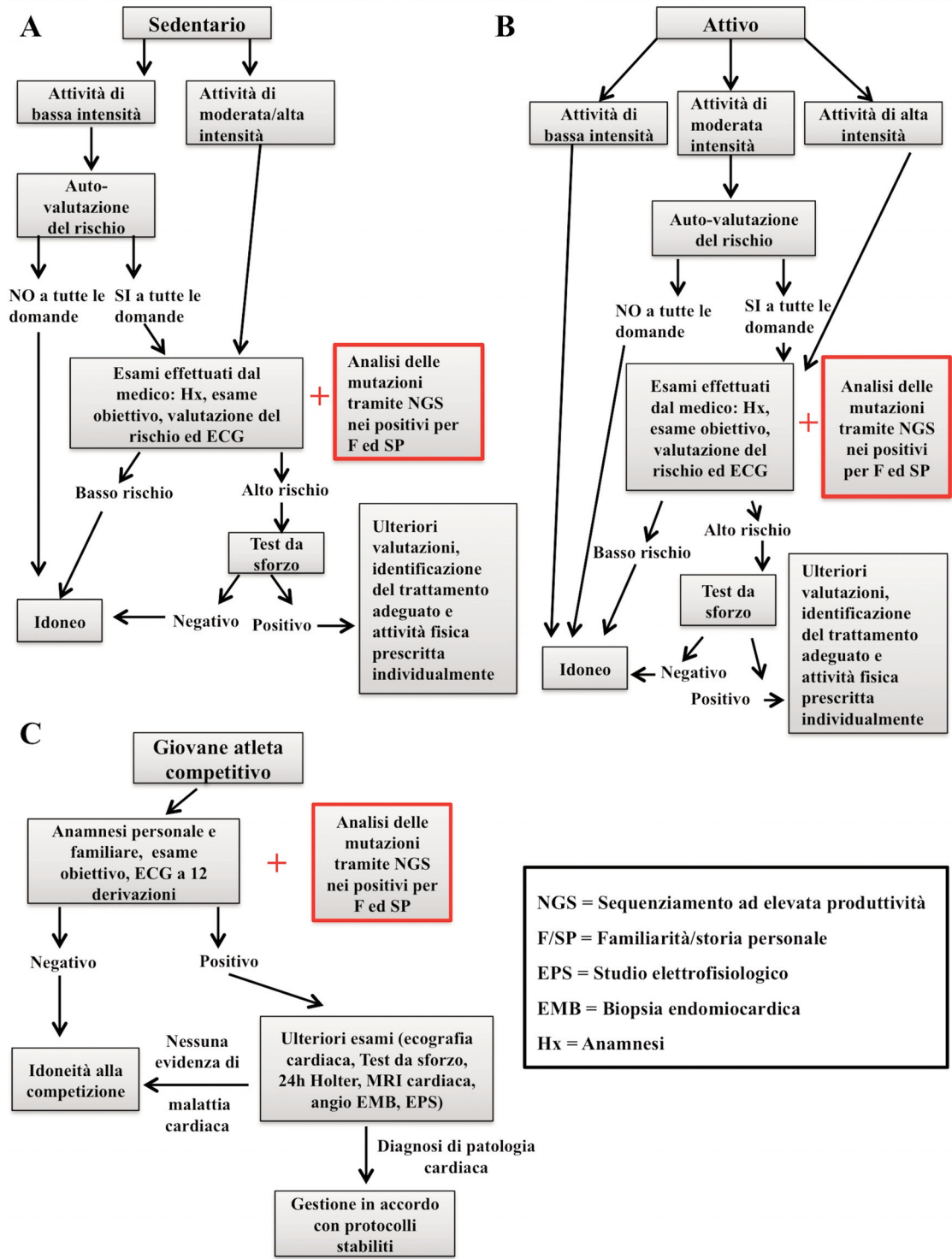
La possibilità di avere sequenze lunghe anche decine di migliaia di nucleotidi, oltre a fornire un valido supporto per l'assemblaggio delle sequenze in fase di analisi bioinformatica dei dati prodotti, permette anche di incrementare l'analisi e l'identificazione di varianti strutturali (SV) e aplotipi complessi. Questo tipo di

approccio riesce a migliorare l'affidabilità nell'identificazione e la risoluzione delle varianti strutturali. Le sequenze lunghe prodotte non solo possono essere più facilmente allineate ma permettono anche l'individuazione dei punti di rottura causa delle SV (181).

Anche se attualmente i sequenziatori di terza generazione non sono in grado di sostituire completamente quelli di seconda generazione poiché presentano ancora molti limiti legati principalmente all'accuratezza con tassi di errore troppo elevati e pochi dati prodotti, il rapido progresso tecnologico, fa ben sperare e permette di ipotizzare che presto queste metodologie diventeranno di uso comune anche in ambito diagnostico. A supporto di tale tesi un recente studio ha riportato l'analisi di un pannello di geni mediante sequenziamento di terza generazione mostrando le potenzialità di tali tecnologie per lo sviluppo di future applicazioni (182). Considerate le caratteristiche e l'eterogeneità genotipica e fenotipica delle cardiopatie qui considerate, nonché le grandi dimensioni di molti dei geni associati a tali patologie, l'implementazione di nuovi protocolli diagnostici basati su tecniche di sequenziamento di terza generazione potrebbe rappresentare un'ulteriore miglioramento in termini di sensibilità diagnostica e di medicina predittiva.

### CONCLUSIONI

Lo scopo di questa rassegna è quello di evidenziare una delle possibilità della medicina predittiva nel campo di un evento drammatico che potrebbe verificarsi nel corso di attività fisica intensa, come spesso si legge o si apprende nella pratica clinica legata allo sport. Infatti, è vero che le linee guida internazionali sono state restie ad indicare le indagini genetiche come metodologie per la prevenzione di possibili danni nell'avvio allo sport di atleti o nell'attività motoria intensiva prodromica allo sport competitivo o anche dilettantistico. Noi (F.S.) riteniamo che la medicina predittiva (146, 57) possa dare un contributo di tutto rilievo nell'evitare eventi gravi in persone che praticano o iniziano a praticare tali attività e che abbiano avuto episodi anche transitori nella storia personale oppure appartengano a famiglie che abbiano nei loro membri manifestazioni di patologie cardiache riconducibili a possibili alterazioni genetiche. E questo con particolare riguardo ad atleti e/o sportivi appartenenti a famiglie in cui segni, sintomi o eventi di patologie cardiache possano essere già stati noti o evidenziati. Infatti, fin dal 2012 abbiamo prospettato che tale prassi (Figura 3), relativa alle indagini molecolari, possa essere introdotta (183). Infine, vi è da dire che recenti risultati iniziano ad indicare che farmaci cosiddetti molecolari potrebbero modificare gli effetti nocivi di specifiche mutazioni tipicamente presenti in patologie genetiche: questo potrebbe diventare nel futuro un utile approccio farmacologico per contrastare gli effetti dannosi mutazionali (184).



**Figura 3**  
**Flussi di sequenze operative per la prevenzione cardiologica in diverse tipologie di soggetti inclusi gli sportivi/atleti.**  
 Questi flussi, propongono l'importanza dei test genetici per la medicina predittiva e per la prevenzione della morte improvvisa in soggetti che potessero avere predisposizione a livello di specifiche sequenze alterate (varianti geniche) di DNA.  
 Pannelli A e B: Flussi di operatività diagnostica per lo screening di soggetti sedentari (A) e in attività (B) ai fini della eleggibilità all'attività motoria e sportiva. Pannello C: idem per i giovani atleti di "elite" o per attività sportiva di tipo competitivo.  
 La figura è tradotta dal riferimento 183 e modificata (rettangolo rosso) come nella relazione di F. Salvatore "Valori e limiti dei test genetici in medicina dello sport", tenutasi al Senato della Repubblica il 17 luglio 2012.

## BIBLIOGRAFIA

1. Karlsen T, Aamot IL, Haykowsky M, et al. High Intensity Interval Training for Maximizing Health Outcomes. *Prog Cardiovasc Dis* 2017;60:67-77.
2. Harber MP, Kaminsky LA, Arena R, et al. Impact of Cardiorespiratory Fitness on All-Cause and Disease-Specific Mortality: Advances Since 2009. *Prog Cardiovasc Dis* 2017;60:11-20.
3. Lee DC, Brellenthin AG, Thompson PD, et al. Running as a Key Lifestyle Medicine for Longevity. *Prog Cardiovasc Dis* 2017;60:45-55.
4. Lee DC, Pate RR, Lavie CJ, et al. Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:472-81.
5. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, et al. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update - A scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2007;116:572-84.
6. Adams V, Reich B, Uhlemann M, et al. Molecular effects of exercise training in patients with cardiovascular disease: focus on skeletal muscle, endothelium, and myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;313:H72-H88.
7. Finocchiaro G, Sharma S. The Safety of Exercise in Individuals With Cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 2016;32:467-74.
8. Corrado D, Basso C, Rizzoli G, et al. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol* 2003;42: 1959-63.
9. Finocchiaro G, Papadakis M, Robertus JL, et al. Etiology of Sudden Death in Sports: Insights From a United Kingdom Regional Registry. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2108-15.
10. Maron BJ, Haas TS, Ahluwalia A, et al. Demographics and Epidemiology of Sudden Deaths in Young Competitive Athletes: From the United States National Registry. *Am J Med* 2016;129:1170-77.
11. Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* 2015;36:2793-867.
12. Arrigan MT, Killeen RP, Dodd JD, et al. Imaging spectrum of sudden athlete cardiac death. *Clin Radiol* 2011;66:203-23.
13. Pigozzi F, Rizzo M. Sudden death in competitive athletes. *Clin Sports Med* 2008;27:153-81, ix.
14. Hasselqvist-Ax I, Riva G, Herlitz J, et al. Early cardiopulmonary resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest. *N Engl J Med* 2015;372:307-15.
15. Kudenchuk PJ, Brown SP, Daya M, et al. Amiodarone, Lidocaine, or Placebo in Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *N Engl J Med* 2016;374:711-22.
16. Marijon E, Uy-Evanado A, Reinier K, et al. Response to Letter Regarding Article, "Sudden Cardiac Arrest During Sports Activity in Middle Age". *Circulation* 2015;132:356.
17. Berdowski J, de Beus MF, Blom M, et al. Exercise-related out-of-hospital cardiac arrest in the general population: incidence and prognosis. *Eur Heart J* 2013;34:3616-23.
18. Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, et al. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation* 2010;81:1479-87.
19. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2015 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2015;131:E29-E322.
20. Asif IM, Harmon KG. Incidence and Etiology of Sudden Cardiac Death: New Updates for Athletic Departments. *Sports Health* 2017;9:268-79.
21. Wasfy MM, Hutter AM, Weiner RB. Sudden Cardiac Death in Athletes. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* 2016;12:76-80.
22. Marijon E, Uy-Evanado A, Reinier K, et al. Sudden cardiac arrest during sports activity in middle age. *Circulation* 2015;131:1384-91.
23. Mazzaccara C, Redi A, Lemme E, et al. Impact of molecular diagnostics in an asymptomatic amateur athlete found to be affected by hypertrophic cardiomyopathy. *Med Sport* 2018;71:405-12.
24. Arbustini E, Narula N, Tavazzi L, et al. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:304-18.
25. Quenin P, Kyndt F, Mabo P, et al. Clinical Yield of Familial Screening After Sudden Death in Young Subjects: The French Experience. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2017;10:e005236.
26. Barletta V, Fabiani I, Lorenzo C, et al. Sudden Cardiac Death: A Review Focused on Cardiovascular Imaging. *J Cardiovasc Echogr* 2014;24:41-51.
27. Zorzi A, Pelliccia A, Corrado D. Inherited cardiomyopathies and sports participation. *Neth Heart J* 2018;26:154-65.
28. Asif IM, Yim ES, Hoffman JM, et al. Update: Causes and symptoms of sudden cardiac death in young athletes. *Phys Sportsmed* 2015;43:44-53.
29. Harmon KG, Asif IM, Maleszewski JJ, et al. Incidence, Cause, and Comparative Frequency of Sudden Cardiac Death in National Collegiate Athletic Association Athletes: A Decade in Review. *Circulation* 2015;132:10-9.
30. Holst AG, Winkel BG, Theilade J, et al. Incidence and etiology of sports-related sudden cardiac death in Denmark-Implications for preparticipation screening. *Heart Rhythm* 2010;7:1365-71.
31. Margey R, Roy A, Tobin S, et al. Sudden cardiac death in 14-to 35-year olds in Ireland from 2005 to 2007: a retrospective registry. *Europace* 2011;13:1411-18.
32. Suarez-Mier MP, Aguilera B, Mosquera RM, et al. Pathology of sudden death during recreational sports in Spain. *Forensic Sci Int* 2013;226:188-96.
33. de Noronha SV, Behr ER, Papadakis M, et al. The importance of specialist cardiac histopathological examination in the investigation of young sudden cardiac deaths. *Europace* 2014;16:899-907.
34. Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, et al. Sudden Deaths in Young Competitive Athletes Analysis of 1866 Deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation* 2009;119:1085-92.
35. Basso C, Corrado D, Thiene G. Sudden cardiac death in the young: Is there an age-dependency of various substrates? *Lab Invest* 2003;83:4A-4A.
36. Corrado D, Zorzi A. Sudden death in athletes. *Int J Cardiol* 2017;237:67-70.
37. Napolitano C, Bloise R, Monteforte N, et al. Sudden cardiac death and genetic ion channelopathies: long QT, Brugada, short QT, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* 2012;125:2027-34.

38. Noyes AM, Zhou AY, Gao G, et al. Abnormal sodium channel mRNA splicing in hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2017;249:282-86.
39. Detta N, Frisso G, Zullo A, et al. Novel deletion mutation in the cardiac sodium channel inactivation gate causes long QT syndrome. *Int J Cardiol* 2013;165:362-5.
40. McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research* 2017;121:722-30.
41. Chandra N, Bastiaenen R, Papadakis M, et al. Sudden cardiac death in young athletes: practical challenges and diagnostic dilemmas. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1027-40.
42. Arbustini E, Narula N, Dec GW, et al. The MOGE(S) Classification for a Phenotype-Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation. *Glob Heart* 2013;8:355-82.
43. Westphal JG, Rigopoulos AG, Bakogiannis C, et al. The MOGE(S) classification for cardiomyopathies: current status and future outlook. *Heart Fail Rev* 2017;22:743-52.
44. Jacoby D, McKenna WJ. Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2012;33:296-U163.
45. Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Mechanisms of Disease Inherited Cardiomyopathies. *N Engl J Med* 2011;364:1643-56.
46. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy After 20 Years Clinical Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:705-15.
47. Norton N, Li DX, Rampersaud E, et al. Exome Sequencing and Genome-Wide Linkage Analysis in 17 Families Illustrate the Complex Contribution of TTN Truncating Variants to Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6:144-153.
48. Hershberger RE, Siegfried JD. Update 2011: Clinical and Genetic Issues in Familial Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1641-49.
49. Jarcho JA, McKenna W, Pare JAP, et al. Mapping a Gene for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy to Chromosome-14q1. *N Engl J Med* 1989;321:1372-78.
50. Meder B, Ruhle F, Weis T, et al. A genome-wide association study identifies 6p21 as novel risk locus for dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2014;35:1069-77.
51. Villard E, Perret C, Gary F, et al. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2011;32:1065-76.
52. Wilde AAM, Amin A. Channelopathies, genetic testing and risk stratification. *Int J Cardiol* 2017;237:53-55.
53. Mazzanti A, Underwood K, Nevelev D, et al. The new kids on the block of arrhythmogenic disorders: Short QT syndrome and early repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2017;28:1226-36.
54. Detta N, Frisso G, Limongelli G, et al. Genetic analysis in a family affected by sick sinus syndrome may reduce the sudden death risk in a young aspiring competitive athlete. *Int J Cardiol* 2014;170:E63-E65.
55. Garcia-Elias A, Benito B. Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *Int J Mol Sci* 2018;19:692.
56. Ackerman MJ, Mohler PJ. Defining a new paradigm for human arrhythmia syndromes: phenotypic manifestations of gene mutations in ion channel- and transporter-associated proteins. *Circ Res* 2010;107:457-65.
57. D'Argenio V, Esposito MV, Nunziato M, et al. Molecular diagnosis of Brugada syndrome via next-generation sequencing of a multigene panel in a young athlete. *Med Sport* 2018;71:27-34.
58. Juang MJM, Horie M. Genetics of Brugada syndrome. *J Arrhythm* 2016;32: 418-25.
59. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies. *Heart Rhythm* 2011;8:1308-39.
60. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies. *Europace* 2011;13:1077-109.
61. Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet* 2016;61:51-55.
62. Mizusawa Y. Recent advances in genetic testing and counseling for inherited arrhythmias. *J Arrhythm* 2016;32:389-97.
63. Velcea AE, Siliste C, Vinereanu D. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia - Looking to the Future. *Maedica (Buchar)* 2017;12:306-10.
64. Sumitomo N. Current topics in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Arrhythm* 2016;32:344-51.
65. Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2015;1854:1502-9.
66. Zullo A, Frisso G, Detta N, et al. Allelic Complexity in Long QT Syndrome: A Family-Case Study. *Int J Mol Sci* 2017;18:E1633.
67. Makita N, Behr E, Shimizu W, et al. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 2008;118:2219-29.
68. Nyegaard M, Overgaard MT, Sondergaard MT, et al. Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet* 2012;91:703-12.
69. Yin G, Hassan F, Haroun AR, et al. Arrhythmogenic calmodulin mutations disrupt intracellular cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> regulation by distinct mechanisms. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e000996.
70. Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, et al. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006;114:2104-12.
71. Motloch LJ, Larbig R, Darabi T, et al. Long-QT syndrome-associated caveolin-3 mutations differentially regulate the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 4. *Physiol Int* 2017;104:130-38.
72. Marx SO, Marks AR. Regulation of the ryanodine receptor in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2002;97 Suppl 1:149-51.
73. Hulme JT, Westenbroek RE, Scheuer T, et al. Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during beta1-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16574-9.
74. Wu G, Ai T, Kim JJ, et al. alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:193-201.
75. El Refaey MM, Mohler PJ. Ankyrins and Spectrins in Cardiovascular Biology and Disease. *Front Physiol* 2017;8:852.
76. Koenig SN, Mohler PJ. The evolving role of ankyrin-B in cardiovascular disease. *Heart Rhythm* 2017;14:1884-89.
77. Le Scouarnec S, Karakachoff M, Gourraud JB, et al. Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome. *Hum Mol Genet* 2015;24:2757-63.
78. Hershberger RE, Parks SB, Kushner JD, et al. Coding Sequence Mutations Identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSR3, LBD3, and TCAP from 313 Patients with Familial or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Cts-Clinical and Translational Science* 2008;1:21-26.
79. Waldmuller S, Schroeder C, Sturm M, et al. Targeted 46-gene and clinical exome sequencing for mutations causing cardiomyopathies. *Mol Cell Probes* 2015;29:308-

- 14.
80. Girolami F, Frisso G, Benelli M, et al. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *J Cardiovasc Med* 2018;19:1-11.
  81. Mazzaccara C, Limongelli G, Petretta M, et al. A common polymorphism in the SCN5A gene is associated with dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2018;19:344-50.
  82. Sheikh F, Ross RS, Chen J. Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:182-90.
  83. Kowalczyk AP, Green KJ. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;116:95-118.
  84. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:572-87.
  85. Azaouagh A, Churzidse S, Konorza T, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a review and update. *Clin Res Cardiol* 2011;100:383-94.
  86. Corrado D, Wichter T, Link MS, et al. Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. *Circulation* 2015;132:441-53.
  87. Protonotarios A, Anastasakis A, Panagiotakos DB, et al. Arrhythmic risk assessment in genotyped families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Europace* 2016;18:610-6.
  88. Alcalde M, Campuzano O, Sarquella-Brugada G, et al. Clinical interpretation of genetic variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2015;104:288-303.
  89. Pilichou K, Thiene G, Bauce B, et al. Arrhythmogenic cardiomyopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:33.
  90. Bhonsale A, Groeneweg JA, James CA, et al. Impact of genotype on clinical course in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated mutation carriers. *Eur Heart J* 2015;36:847-55.
  91. Groeneweg JA, Bhonsale A, James CA, et al. Clinical Presentation, Long-Term Follow-Up, and Outcomes of 1001 Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Patients and Family Members. *Circ Cardiovasc Genet* 2015;8:437-46.
  92. Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2006;116:2012-21.
  93. Elliott P, O'Mahony C, Syrris P, et al. Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:314-22.
  94. van Hengel J, Calore M, Bauce B, et al. Mutations in the area composita protein alphaT-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013;34:201-10.
  95. Mayosi BM, Fish M, Shaboodien G, et al. Identification of Cadherin 2 (CDH2) Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2017;10:e001605.
  96. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Re* 2017;121: 749-70.
  97. Sabater-Molina M, Saura D, Garcia-Molina Saez E, et al. A Novel Founder Mutation in MYBPC3: Phenotypic Comparison With the Most Prevalent MYBPC3 Mutation in Spain. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2017;70:105-14.
  98. Ho CY, Charron P, Richard P, et al. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res* 2015;105:397-408.
  99. Lakdawala NK, Funke BH, Baxter S, et al. Genetic testing for dilated cardiomyopathy in clinical practice. *J Card Fail* 2012;18:296-303.
  100. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:531-47.
  101. Japp AG, Gulati A, Cook SA, et al. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2016;67: 2996-3010.
  102. Favalli V, Serio A, Grasso M, et al. Genetic causes of dilated cardiomyopathy. *Heart* 2016;102:2004-14.
  103. Zhao Y, Feng Y, Zhang YM, et al. Targeted next-generation sequencing of candidate genes reveals novel mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Mol Med* 2015;36:1479-86.
  104. Tabish AM, Azzimato V, Alexiadis A, et al. Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of dilated cardiomyopathy. *Biophys Rev* 2017;9:207-23.
  105. Knoll R, Buyandelger B, Lab M. The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:569628.
  106. Taylor M, Graw S, Sinagra G, et al. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation* 2011;124: 876-85.
  107. Brun F, Barnes CV, Sinagra G, et al. Titin and desmosomal genes in the natural history of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Med Genet* 2014;51:669-76.
  108. Lazzarini E, Jongbloed JDH, Pilichou K, et al. The ARVD/C Genetic Variants Database: 2014 Update. *Hum Mutat.* 2015;36:403-10.
  109. Garcia-Pavia P, Cobo-Marcos M, Guzzo-Merello G, et al. Genetics in dilated cardiomyopathy. *Biomark Med* 2013;7:517-33.
  110. Staab J, Ruppert V, Pankuweit S, et al. Polymorphisms in genes encoding nonsarcomeric proteins and their role in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Herz* 2012;37:836-41.
  111. Vatta M, Faulkner G. Cytoskeletal basis of ion channel function in cardiac muscle. *Future Cardiol* 2006;2:467-76.
  112. Sadeghi A, Doyle AD, Johnson BD. Regulation of the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel by the actin-binding proteins alpha-actinin and dystrophin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1502-C11.
  113. Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, et al. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail* 2006;8:477-83.
  114. Zhou C, Li C, Zhou B, et al. Novel nesprin-1 mutations associated with dilated cardiomyopathy cause nuclear envelope disruption and defects in myogenesis. *Hum Mol Genet.* 2017;26:2258-76.
  115. Captur G, Arbustini E, Bonne G, et al. Lamin and the heart. *Heart* 2018;104: 468-79.
  116. Forleo C, Carmosino M, Resta N, et al. Clinical and Functional Characterization of a Novel Mutation in Lamin A/C Gene in a Multigenerational Family with Arrhythmogenic Cardiac Laminopathy. *PLoS One* 2015;10:e0121723.
  117. Paller MS, Martin CM, Pierpont ME. Restrictive cardiomyopathy: an unusual phenotype of a lamin A variant. *ESC Heart Fail* 2018;5:724-6.
  118. Lazzarini E, Jongbloed JD, Pilichou K, et al. The ARVD/C genetic variants database: 2014 update. *Hum Mutat* 2015;36:403-10.
  119. Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is

- a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet* 2008;82:809-21.
120. Oomen A, Semsarian C, Puranik R, et al. Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Progress and Pitfalls. *Heart Lung Circ* 2011;27:1310-7.
  121. Calkins H, Corrado D, Marcus F. Risk Stratification in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation* 2017;136:2068-82.
  122. Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol* 2016;263:179-91.
  123. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol* 2017;241:236-50.
  124. Nardelli C, Labruna G, Liguori R, et al. Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int* 2013;2013: 631082.
  125. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16080.
  126. Liguori R, Mazzaccara C, Pasanisi F, et al. The mtDNA 15497 G/A polymorphism in cytochrome b in severe obese subjects from Southern Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:466-70.
  127. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 2013;106: 135-59.
  128. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 2010;1797:113-28.
  129. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:1-22.
  130. Brunel-Guitton C, Levtova A, Sasarman F. Mitochondrial Diseases and Cardiomyopathies. *Can J Cardiol* 2015;31: 1360-76.
  131. Limongelli G, Masarone D, D'Alessandro R, et al. Mitochondrial diseases and the heart: an overview of molecular basis, diagnosis, treatment and clinical course. *Future Cardiol* 2012;8:71-88.
  132. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial Cardiomyopathy Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Tex Heart J* 2013;40: 385-94.
  133. El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial Cardiomyopathies. *Front Cardiovasc Med* 2016;3:199-206.
  134. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, et al. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol* 2012;226: 274-86.
  135. Limongelli G, Masarone D, Pacileo G. Mitochondrial disease and the heart. *Heart* 2017;103:390-98.
  136. Lee SR, Han J. Mitochondrial Mutations in Cardiac Disorders. *Adv Exp Med Biol* 2017;982:81-111.
  137. Ng YS, Grady JP, Lax NZ, et al. Sudden adult death syndrome in m.3243A>G-related mitochondrial disease: an unrecognized clinical entity in young, asymptomatic adults. *Eur Heart J* 2016;37:2552-59.
  138. Mazzaccara C, Iafusco D, Liguori R, et al. Mitochondrial diabetes in children: seek and you will find it. *PLoS One* 2012;7:e34956.
  139. Stein R, Trujillo JP, Silveira ADD, et al. Genetic Evaluation, Familial Screening and Exercise. *Arq Bras Cardiol* 2017;108:263-70.
  140. Care M, Chauhan V, Spears D. Genetic Testing in Inherited Heart Diseases: Practical Considerations for Clinicians. *Curr Cardiol Rep* 2017;19:88.
  141. Precone V, Del Monaco V, Esposito MV, et al. Cracking the Code of Human Diseases Using Next-Generation Sequencing: Applications, Challenges, and Perspectives. *Biomed Res Int* 2015;2015:161648.
  142. D'Argenio V, Notomista E, Petrillo M, et al. Complete sequencing of *Novosphingobium* sp. PP1Y reveals a biotechnologically meaningful metabolic pattern. *BMC Genomics* 2014;15:384.
  143. D'Argenio V, Petrillo M, Pasanisi D, et al. The complete 12 Mb genome and transcriptome of *Nonomuraea gerenzanensis* with new insights into its duplicated "magic" RNA polymerase. *Sci Rep* 2016;6:18.
  144. Choudhury A, Ramsay M, Hazelhurst S, et al. Whole-genome sequencing for an enhanced understanding of genetic variation among South Africans. *Nat Commun* 2017;8:2062.
  145. Robbe P, Popitsch N, Knight SJL, et al. Clinical whole-genome sequencing from routine formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: pilot study for the 100,000 Genomes Project. *Genet Med* 2018;20:1196-205.
  146. D'Argenio V, Frisso G, Precone V, et al. DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *J Mol Diagn* 2014;16:32-44.
  147. Talundzic E, Ravishankar S, Kelley J, et al. Next-Generation Sequencing and Bioinformatics Protocol for Malaria Drug Resistance Marker Surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e02474-17.
  148. Bergougou A, D'Argenio V, Sollfrank S, et al. Multicenter validation study for the certification of a CFTR gene scanning method using next generation sequencing technology. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1046-53.
  149. Mahdiah N, Mikaeeli S, Tavasoli AR, et al. Genotype, phenotype and in silico pathogenicity analysis of HEXB mutations: Panel based sequencing for differential diagnosis of gangliosidosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2018;167:43-53.
  150. Ashton EJ, Legrand A, Benoit V, et al. Simultaneous sequencing of 37 genes identified causative mutations in the majority of children with renal tubulopathies. *Kidney Int* 2018;93:961-67.
  151. Morishita A, Iwama H, Fujihara S, et al. Targeted sequencing of cancer-associated genes in hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *Oncol Lett* 2018;15:528-32.
  152. Abhyankar A, Lamendola-Essel M, Brennan K, et al. Clinical whole exome sequencing from dried blood spot identifies novel genetic defect underlying asparagine synthetase deficiency. *Clinic Case Rep* 2018;6:200-05.
  153. Haskell GT, Adams MC, Fan Z, et al. Diagnostic utility of exome sequencing in the evaluation of neuromuscular disorders. *Neurol Genet* 2018;4:e212.
  154. Aarabi M, Sniezek O, Jiang HY, et al. Importance of complete phenotyping in prenatal whole exome sequencing. *Hum Genet* 2018;137:175-81.
  155. Sanna V, Zarrilli F, Nardiello P, et al. Mutational spectrum of F8 gene and prothrombotic gene variants in haemophilia A patients from Southern Italy. *Haemophilia* 2008;14:796-803.
  156. Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, et al. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 2009;302:1076-83.
  157. Marum JE, Yeung DT, Purins L, et al. ASXL1 and BIM germ line variants predict response and identify CML patients with the greatest risk of imatinib failure. *Blood Adv* 2017;1:1369-81.
  158. Hung SS, Meissner B, Chavez EA, et al. Assessment of Capture and Amplicon-Based Approaches for the Development of a Targeted Next-Generation Sequencing Pipeline to Personalize Lymphoma Management. *J Mol Diagn* 2018;20:203-14.
  159. Nunziato M, Esposito MV, Starnone F, et al. A multi-gene panel beyond BRCA1/BRCA2 to identify new breast cancer-predisposing mutations by a picodroplet PCR followed by a next-generation sequencing strategy: a pilot study. *Anal Chim Acta* 2019;1046:154-162.
  160. Watson CM, Crinnion LA, Morgan JE, et al. Robust

- Diagnostic Genetic Testing Using Solution Capture Enrichment and a Novel Variant-Filtering Interface. *Hum Mutat* 2014;35:434-41.
161. Hodges E, Xuan Z, Balija V, et al. Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet* 2007;39:1522-7.
162. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods* 2007;4:903-5.
163. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27:182-9.
164. Mertes F, Elsharawy A, Sauer S, et al. Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Brief Funct Genomics* 2011;10:374-86.
165. Schmidt B, Hildebrandt A. Next-generation sequencing: big data meets high performance computing. *Drug Discov Today* 2017;22:712-17.
166. Caspar SM, Dubacher N, Kopps AM, et al. Clinical sequencing: From raw data to diagnosis with lifetime value. *Clin Genet* 2018;93:508-19.
167. Cecconi M, Parodi MI, Formisano F, et al. Targeted next-generation sequencing helps to decipher the genetic and phenotypic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Mol Med* 2016;38:1111-24.
168. Leong IUS, Stuckey A, Belluoccio D, et al. Massively Parallel Sequencing of Genes Implicated in Heritable Cardiac Disorders: A Strategy for a Small Diagnostic Laboratory. *Med Sci (Basel)* 2017;5:E22.
169. Forleo C, D'Erchia AM, Sorrentino S, et al. Targeted next-generation sequencing detects novel gene-phenotype associations and expands the mutational spectrum in cardiomyopathies. *PLoS One* 2017;12:e0181842.
170. Morini E, Sangiuolo F, Caporossi D, et al. Application of Next Generation Sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death. *Front Genet* 2015;6:55.
171. Tiziano FD, Palmieri V, Genuardi M, et al. The Role of Genetic Testing in the Identification of Young Athletes with Inherited Primitive Cardiac Disorders at Risk of Exercise Sudden Death. *Front Cardiovasc Med* 2016;3:28.
172. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, et al. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet* 2018;34:666-81.
173. Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* 2009;323:133-38.
174. Branton D, Deamer DW, Marziali A, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26:1146-53.
175. Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods* 2018;15:201-06.
176. Bleidorn C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and Biodiversity* 2016;14:1-8.
177. Ashton PM, Nair S, Dallman T, et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat Biotechnol* 2015;33:296-300.
178. Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-Sayers S, et al. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome Res* 2015;25:1750-56.
179. Laver T, Harrison J, O'Neill PA, et al. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomol Detect Quantif* 2015;3:1-8.
180. Quick J, Quinlan AR, Loman NJ. A reference bacterial genome dataset generated on the MinION portable single-molecule nanopore sequencer. *Gigascience* 2014;3:22.
181. Sedlazeck FJ, Rescheneder P, Smolka M, et al. Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nat Methods* 2018;15:461-68.
182. Orsini P, Minervini CF, Cumbo C, et al. Design and MinION testing of a nanopore targeted gene sequencing panel for chronic lymphocytic leukemia. *Sci Rep* 2018;8:11798.
183. Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in athletes: what is the role of screening? *Curr Opin Cardiol* 2012;27:41-8.
184. Markossian S, Ang KK, Wilson CG, et al. Small-Molecule Screening for Genetic Diseases. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2018;19:263-88.

## La riorganizzazione del settore dedicato alla diagnostica proteica: un esempio virtuoso fondato su criteri di Evidence Based Laboratory Medicine e di sostenibilità economica

Patrizia Natali, Manuela Varani, Tommaso Trenti

Medicina di Laboratorio, Dipartimento Interaziendale Integrato di Medicina di Laboratorio, Azienda Sanitaria Locale e Azienda Ospedaliera di Modena

### ABSTRACT

**The organization of the protein unit: a beneficial example founded on evidence based laboratory medicine criteria and on the appropriate use of the available resources.** The sustainability of the National Health Service is a current subject of debate due to the pressure that the changes in our societies are having on health systems. Reviewing diagnostic processes is increasingly urgent to contain costs and to maintain the quality of the health services provided. The Evidence Based Laboratory Medicine (EBLM) approach allows to identify and eliminate obsolete methods, replacing them with more adequate ones. The EBLM approach can also provide higher diagnostic accuracy, a rationalisation of diagnostic pathways, a reduction of turnaround-time and a decrease of costs. To reach these objectives, a careful analysis of production processes and assessment of the costs are both necessary. The EBLM approach has been applied to the Protein Unit of Laboratory of Modena. The change in the workflow of the Bence Jones protein determination and the consolidation of the measurement of a number of serum proteins on clinical chemistry analysers allowed a better diagnostic accuracy coupled to important economical savings. The savings made it possible to extend the availability of the free light chains measurements (that before was restricted to patients admitted to the haematology department) to the out-patients of the Province of Modena. The EBLM approach is the most effective way to reach such objectives: really, providing better quality performance does not necessarily correspond to an increase of costs. In addition to developing an adequate level of scientific expertise, the laboratory professional must acquire managerial skills to introduce up-to-date diagnostic methods and to optimize the use of assigned resources, in all areas of laboratory medicine.

### INTRODUZIONE

Il Servizio Sanitario Nazionale (SSN) deve assicurare standard e risultati di salute pubblica coniugandoli con la sostenibilità finanziaria anche in relazione alla innovazione scientifica, alle tendenze demografiche in atto, ai temi della cronicità e fragilità. Il governo del settore sanitario viene solitamente definito come Clinical Governance (1) di cui l'Evidence Based Laboratory Medicine (EBLM) è parte integrante. L'EBLM consiste in un approccio metodologico che dapprima identifica e integra poi nel processo decisionale clinico-diagnostico le evidenze più robuste e rilevanti traslate dalla ricerca, completandosi con l'esperienza del laboratorista per corrispondere al meglio alle necessità del paziente e garantire i migliori esiti di cura (2,3).

I laboratori di analisi, per la relativa facilità di misura

dei volumi delle prestazioni analitiche e degli indicatori economici ad esse associati, ben si prestano a verifiche e revisioni gestionali anche in specifici settori. La riorganizzazione realizzata presso la sezione di diagnostica proteica del dipartimento di medicina di laboratorio della Azienda Sanitaria Locale di Modena, che si occupa principalmente della diagnosi e della gestione dei pazienti con discrasie plasmacellulari, ne è un esempio.

Viene usualmente affidata all'autonomia del singolo laboratorio la scelta di adottare, tra i metodi disponibili, quelli più consoni alla propria organizzazione interna. Il risultato è che i percorsi diagnostico-analitici impiegati in ogni laboratorio presentano una discreta disomogeneità (4) anche in un'area specialistica e ristretta come quella di questa particolare tipologia di diagnostica.

Le linee guida internazionali per lo studio e la

Corrispondenza a: Patrizia Natali, Corelab OCSAE - AUSL Modena, Via Giardini 1355, 41126 Baggiovara di Modena, Tel 059/3961077. E-mail p.natali@ausl.mo.it

Ricevuto: 04.03.2018

Revisionato: 26.06.2018

Accettato: 02.07.2018

Pubblicato on-line: 31.10.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.65

valutazione del paziente affetto da gammopatia monoclonale (GM), indicano tuttavia con precisione gli esami di laboratorio da utilizzare in questo ambito diagnostico: elettroforesi sierica (sELF), immunofissazione sierica (sIFE), determinazione della proteina di Bence Jones (PBJ), misura delle catene leggere libere (sFLC) e delle immunoglobuline sieriche (Ig) (5-7).

Questo specifico settore afferente al corelab del Laboratorio di Modena, dove si concentrano le attività di diagnostica proteica di quasi tutta la provincia, ha rivisto e aggiornato a partire dal 2015, i percorsi diagnostico-analitici per renderli più coerenti alle raccomandazioni fondate sui principi della EBLM, e alle linee guida disponibili, rendendoli nel contempo più efficienti dal punto di vista dell'utilizzo delle risorse disponibili.

Si è operato in più fasi: analisi della organizzazione esistente, azioni di miglioramento secondo un approccio EBLM (abolizione degli esami obsoleti e introduzione di nuovi esami), verifica dei risultati ottenuti (qualità analitica del dato fornito, appropriatezza delle procedure, riduzione dei tempi di risposta, sostenibilità economica), valutazione del nuovo assetto organizzativo.

Scopo di questo lavoro è quello di illustrare il percorso effettuato secondo quanto enunciato poco sopra.

## METODI

### Analisi dei processi

La rivisitazione dei processi è iniziata nella seconda metà 2015. Si è preso quindi il 2014 a riferimento per valutare i cambiamenti messi in atto negli anni successivi fino al 2017, sia sul piano dei percorsi diagnostico-tecnologici, che dell'ottimizzazione delle risorse assegnate.

Non tutte le procedure sono state oggetto di revisione. sELF e sIFE non hanno infatti subito cambiamenti dal 2014 perché ritenuti sufficientemente performanti e quindi non oggetto di prioritaria revisione. Non è stata soggetta a nessuna modifica neppure la determinazione delle Ig già da tempo eseguita in turbidimetria in alta automazione su autoanalizzatori non dedicati. Descriveremo quindi i processi che sono stati oggetto di una rivisitazione delle procedure o delle tecnologie e che hanno avuto un impatto significativo sul piano produttivo, organizzativo, dei costi e della gestione di questo specifico settore del laboratorio.

### *Determinazione della proteina di Bence Jones*

Nel 2014 la determinazione della PBJ veniva eseguita su urine del mattino non sottoposte a concentrazione. Era previsto un primo screening in immunonefelometria (INA) per la misura delle catene leggere libere urinarie (uFLC) al fine di individuare i campioni negativi per PBJ (uFLC <0,5 mg/L). I rimanenti campioni erano sottoposti ad un secondo livello di screening eseguendo una elettroforesi urinaria. Qualora non fosse rilevata una componente monoclonale in

questa fase di screening, i campioni che non appartenevano a pazienti con una pregressa positività per PBJ, o con diagnosi di gammopatia monoclonale (GM), venivano considerati negativi. Su tutti gli altri, si eseguiva un approfondimento mediante uIFE con l'impiego di una miscela di antisieri: anti IgG, IgA, IgM, anti catene kappa e lambda (libere più legate) e anti catene kappa e lambda libere (Sebia, Italia) con un limite di rilevabilità dichiarato dal produttore <10 mg/L (protocollo di lavoro 1). Il tempo di lavorazione era di 3 giorni.

Per verificare l'accuratezza diagnostica di questa modalità operativa, si è intrapreso uno studio sperimentale (8) effettuando la determinazione di PBJ sia misurando le catene leggere con INA, che eseguendo una uIFE su 1000 campioni consecutivi pervenuti in laboratorio con richiesta di PBJ

### *Determinazione di alcune proteine sieriche*

Nel 2014,  $\alpha$ 1-glicoproteina acida (AAG),  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT), aptoglobina (APT),  $\beta$ 2-microglobulina (B2M), lipoproteina-a [Lp(a)] venivano eseguite in INA con nefelometro Immage 800 (Beckman Coulter, Italia).

### *Determinazione delle catene leggere totali sieriche e urinarie*

Nel 2014, venivano determinate in INA anche le catene leggere totali, cioè sia libere che legate alla catena pesante, sieriche (sTLC) e urinarie (uTLC). Tali analisi erano erogate sia per pazienti ricoverati che ambulatoriali.

### *Determinazione delle catene leggere libere sieriche*

La determinazione delle sFLC, nel 2014, veniva erogata solamente per i pazienti ricoverati nei reparti di oncematologia della rete ospedaliera modenese.

Le sFLC erano misurate in INA su nefelometro Immage 800. La metodica, pur essendo in automazione, presentava diverse criticità peraltro già descritte in letteratura (9), tra cui la difficoltà del riconoscimento dell'effetto prozona, non infrequente nei casi di mieloma multiplo (10). Di sovente era necessario impiegare diluizioni seriali dei campioni fino ad ottenere un valore coerente con la diluizione applicata. Per individuare un eventuale eccesso di antigene era necessaria comunque la valutazione da parte di personale di elevata esperienza professionale.

### *Costi e prestazioni erogate nel 2014*

I costi dei reattivi sono stati ottenuti dal software del magazzino del laboratorio, mentre il numero di prestazioni è stato ricavato dal software di elaborazione collegato al sistema informatico di laboratorio (LIS).

Nel 2014 le PBJ erogate erano circa 12.500 all'anno con un costo medio di oltre € 20/cadauna (256.000 €/anno), di cui circa la metà dovuto al costo dello screening in INA.

Per quanto riguarda l'analisi delle proteine sieriche AAG, AAT, APT, B2M, Lp(a), venivano eseguite circa 7.800 determinazioni/anno con un costo di circa 35.000 €/anno.

Circa 3.000 erano invece le determinazioni/anno sia di sTLC che di uTLC per un costo di circa 25.000 €/anno.

In riferimento alle sFLC, a causa della limitazione della loro erogazione ai soli pazienti ricoverati, le determinazioni erano solo circa 350/anno, con un costo di circa 17.500 €.

## RISULTATI

Ogni singola determinazione eseguita è sinteticamente descritta in Tabella 1 nella quale sono specificati strumenti e reattivi utilizzati; in essa è inoltre riportato il confronto tra l'assetto presente nel 2014 e quello del 2017 successivamente alla riorganizzazione. Nella Tabella 2 è invece indicato il numero di determinazioni effettuate negli anni dal 2014 al 2017.

## Azioni di miglioramento

L'analisi dei processi ha permesso di evidenziare le criticità presenti nell'organizzazione e conseguentemente di mettere in atto azioni di miglioramento tese ad ottimizzare l'organizzazione del settore, implementare la qualità del dato prodotto e, non ultimo, abbattere i tempi di lavorazione e i costi.

## Proteina di Bence Jones

In un precedente studio condotto presso il nostro laboratorio (8) le due modalità di determinazione della PBJ (INA e uIFE) sono state messe a confronto. I risultati ottenuti hanno dimostrato una scarsa accuratezza diagnostica di INA rispetto a uIFE ( $K_{Choen} = 0,20$ , CI 95%, 0.15–0.26). È stato rilevato, infatti, un cospicuo numero di campioni falsi positivi e falsi negativi. I dati ottenuti dal nostro studio, associati all'elevato costo della determinazione delle uFLC (Figura 1), hanno condotto alla decisione di eliminare lo screening con INA della PBJ a favore dell'adozione di un nuovo protocollo operativo (protocollo operativo 2) introdotto nel 2015.

Tale protocollo prevede, così come raccomandato dalle linee guida nazionali ed internazionali (7,11,12), che la rilevazione della PBJ avvenga mediante uIFE. Si sono impiegati gli antisieri Sebia: anti-IgG, IgA, IgM (anti-GAM), anti kappa totali e anti lambda totali ottimizzando l'utilizzo della lastra di gel di agarosio (kit Sebia 9 IF Hydragel IF), suddividendo in due parti ogni quadrante predisposto per la corsa di un campione per consentire così di testare 18 campioni per seduta analitica, come dettagliato nello studio (8). Gli antisieri anti- $\kappa$  libere e anti- $\lambda$  libere sono stati impiegati in un secondo momento qualora si rendesse necessario distinguere eventuali Ig complete comigranti con PBJ (9,11,13).

Con questo nuovo protocollo, sono stati eliminati i passaggi di screening previsti dal protocollo 1 (uFLC e

**Tabella 1**

*Esami effettuati e modalità di esecuzione, prima (2014) e dopo (2017) la riorganizzazione*

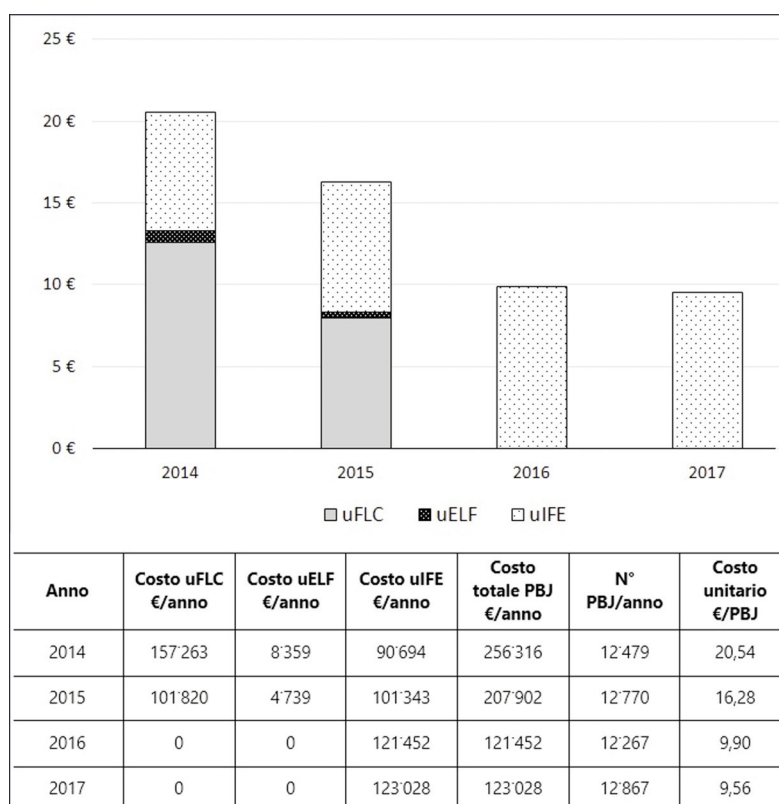
Esame	2014 - Strumento e reattivi	2017 - Strumento e reattivi
Elettroforesi sierica	Capillarys 2 (Sebia, Italia)	Invariato
Immunotipizzazione capillare	Capillarys 2 e kit immunotyping (Sebia, Italia)	Invariato
Immunofissazione sierica	Hydrasys e kit Hydragel IF 2/4 (Sebia, Italia)	Invariato
Elettroforesi urine	Hydrasys e kit Hydragel HR15 (Sebia, Italia)	Invariato
Immunofissazione urine	Hydrasys e kit 2/4 BJ (Sebia, Italia)	Hydrasys e kit 9 IF (Sebia, Italia)
Immunoglobuline (A, G, M)	AU680 e reattivi dedicati (Beckman Coulter SpA, Italia)	Invariato
$\alpha$ 1-glicoproteina acida, $\alpha$ 1-antitripsina, aptoglobina, $\beta$ 2-microglobulina, lipoproteina (a)	Nefelometro Immage 800 e reattivi dedicati (Beckman Coulter SpA, Italia)	AU680 e reattivi dedicati (Beckman Coulter SpA, Italia)
Catene leggere totali sieriche e urinarie	Nefelometro Immage 800 e reattivi dedicati (Beckman Coulter SpA, Italia)	Non più eseguite
Catene leggere libere sieriche	Nefelometro Immage 800 (Beckman Coulter SpA, Italia) Freelite™ Kappa/Lambda (Binding Site, Italia)	Turbidimetro Optilite e Freelite™ Kappa/Lambda Free (Binding Site, Italia)
Catene leggere libere urinarie	Nefelometro Immage 800, (Beckman Coulter SpA, Italia)  Free Light Chains Kit NSC (New Scientific Company, Italia)	Non più eseguite

**Tabella 2**

Tipologia e numero di determinazioni/anno eseguite nel settore dedicato

Anno	IgG, IgA, IgM	sELF+sIFE	uFLC	uIFE	uTLC	sTLC	sFLC	Proteine sieriche
2014	37.272	162.337	11.406	12.497	3.287	3.075	326	7.887
2015	34.953	159.758	7.389	12.770	3.247	3.133	380	6.057
2016	36.623	155.192	0	12.267	975	1.058	2.226	0
2017	37.270	154.211	0	12.867	0	0	5.096	0

IgG, IgA, IgM, somma delle determinazioni di immunoglobuline sieriche; sELF+sIFE somma di elettroforesi e immunotipizzazione in tecnica capillare, e immunofissazione sierica; uFLC, catene leggere libere urinarie; uIFE, immunofissazione urinaria; uTLC, catene leggere totali urinarie; sTLC, catene leggere totali sieriche; sFLC catene leggere libere sieriche; proteine sieriche, somma di  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-glicoproteina acida, aptoglobina,  $\beta$ 2-microglobulina, lipoproteina-a.

**Figura 1**

Analisi dei costi di produzione della proteina di Bence Jones (PBJ). L'istogramma evidenzia il costo unitario per PBJ con la distinzione delle fasi di screening con immunonefelometria (uINA), elettroforesi urinaria (uELF) e della successiva fase di conferma con immunofissazione urinaria (uIFE). Si noti come l'introduzione del nuovo protocollo di lavoro dalla seconda metà del 2015 abbia portato ad un dimezzamento dei costi dal 2014 al 2016-17.

uELF) con conseguente risparmio nella gestione del campione e riduzione del tempo di lavorazione da tre ad un solo giorno.

#### Proteine sieriche

Nel 2016 si è proceduto a trasferire la determinazione di AAG, AAT, APT, B2M, Lp(a), dalla

nefelometria con Immage 800 a strumenti ad alta automazione di immunochimica AU680 (Tabella 1). Tale passaggio è stato preceduto da una verifica della concordanza tra il metodo nefelometrico in uso e il metodo turbidimetrico dello strumento AU680. I dati sperimentali sono stati valutati applicando i criteri proposti delle linee guida SIBioC (14) ed i risultati ottenuti, considerando anche la variabilità biologica,

hanno permesso di validare la concordanza tra i due metodi (15). L'effettiva integrazione della determinazione di queste proteine sieriche in automazione ha consentito di ottimizzare il processo analitico aumentando l'efficienza produttiva e la rapidità di esecuzione delle analisi.

#### *Catene leggere totali*

La misurazione delle catene leggere totali (TLC) fornisce un dato che comprende in maniera indistinta sia le catene leggere libere che quelle legate alla catena pesante dell'immunoglobulina, rendendo questo indicatore scarsamente specifico e quindi non efficace nella gestione del paziente affetto da GM (16,17).

Nel 2016 si è proceduto a sostituire la determinazione delle sTLC con la misurazione di sFLC e la determinazione di PBJ nelle urine al posto delle uTLC, marcatori più appropriati come indicato dalle linee guida (5,18), azzerando così sia le determinazioni che i costi relativi.

#### *Catene leggere libere sieriche*

Alla fine 2016 il nefelometro Immage 800 è stato abbandonato e sostituito dal turbidimetro Optilite specifico per la determinazione delle sFLC (19). Il punto di forza di questo strumento è la capacità di rilevare automaticamente l'eccesso di antigene grazie ad una lettura cinetica della reazione immunochimica a più tempi. In caso si verifichi l'effetto prozona, con l'ausilio di un software dedicato, lo strumento è in grado di eseguire automaticamente la diluizione del campione in progressione seriale logaritmica fino a quando la concentrazione rilevata è coerente con la diluizione applicata.

#### **Analisi dei costi**

Confrontando il 2016 con il 2014 si evince che, a parità di prestazioni, un importante risparmio - circa € 135.000 - si è ottenuto nell'ambito della determinazione della PBJ. L'adozione del protocollo di lavoro 2 con l'eliminazione della determinazione delle uFLC, ha prodotto un risparmio di € 157.000 a cui ha fatto seguito un lieve aumento di spesa per le uIFE di € 24.000. Il costo per ogni singola determinazione di PBJ si è quindi più che dimezzato passando da € 20 a meno di € 10 (Figura 1). Le proteine sieriche AAT, AAG, APT, B2M, Lp(a), come già avvenuto in precedenza per le immunoglobuline, sono state dislocate in Corelab su strumenti ad elevata automazione senza aggravio di costi per il Laboratorio. Ciò ha consentito di ottimizzare i flussi di lavoro, portando ad un recupero di circa 35.000 €/anno. Ulteriori risparmi per € 26.000 sono derivati dalla dismissione delle TLC sia sieriche che urinarie.

Gli interventi illustrati hanno prodotto un abbattimento complessivo dei costi della diagnostica proteica di circa € 138.000 nell'anno 2016 rispetto al 2014, risorse che sono state ricollocate estendendo nel 2017 l'erogazione delle sFLC dai soli pazienti dei reparti

di oncoematologia a tutti quelli dell'intero territorio modenese, compresi gli ambulatoriali.

Considerando che la misura di sFLC sostituiva anche le 3.000 sTLC non più fornite, in base ad una prima stima si è ipotizzato che l'ampliamento dell'erogazione delle sFLC avrebbe portato ad un incremento da 350 a 3.500 determinazioni all'anno: alla fine del 2017 le sFLC erogate sono state oltre 5.000, con un aumento del 40% rispetto le previsioni, a cui corrisponde un costo di € 177.000.

In sintesi, il costo annuo complessivo dedicato alla gestione del settore proteine nel 2014 era circa di € 610.000, nel 2015 di € 562.000, ha raggiunto il suo minimo nel 2016 con € 472.000, infine nel 2017 si attestato su € 602.000. Tra il 2014, anno di riferimento e il 2017 non si notano sensibili differenze di costi, ma il vero divario si rileva nella offerta di analisi più appropriate e più rispondenti alle esigenze sia dei clinici che dei pazienti (Figura 2).

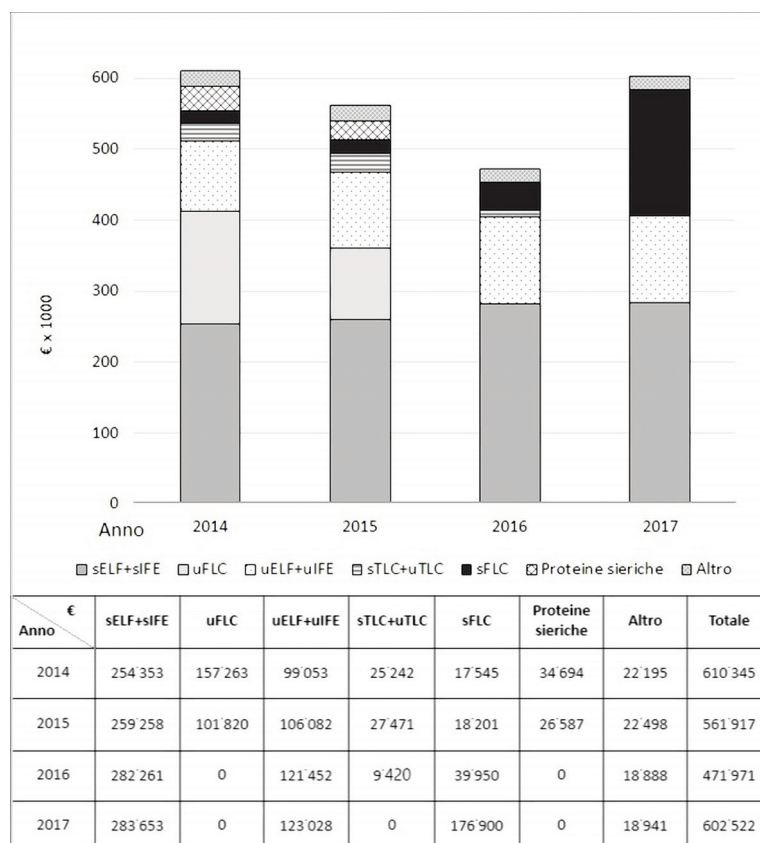
#### **DISCUSSIONE**

Il lavoro di revisione delle procedure secondo i principi dell'EBLM ha prodotto importanti risultati. L'impatto più incisivo è stato sulla diagnostica della PBJ con l'eliminazione delle fasi di screening e l'esecuzione di uIFE direttamente su tutti i campioni. Nonostante uIFE sia una metodica ad elevato impegno manuale, il suo impiego ha permesso di aumentare l'accuratezza diagnostica, di ottenere una significativa semplificazione a livello organizzativo, un'ottimizzazione del processo di gestione del campione, una riduzione del tempo di lavorazione e soprattutto un notevole risparmio di risorse economiche.

Pur riconoscendo la centralità di sFLC nella gestione del paziente affetto da GM (20), la sua esecuzione nella realtà modenese ha presentato fino al 2016 due importanti criticità. Primo, non era tra i parametri compresi nei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA) regionali e quindi tra le prestazioni erogabili dal Servizio Sanitario Regionale dell'Emilia Romagna; un secondo aspetto riguardava l'elevato costo: rendere tale diagnostica disponibile a tutti gli utenti della Provincia avrebbe determinato un significativo impatto economico.

Per tali motivi nel 2014 le sFLC erano erogate solo in regime di ricovero per i reparti di oncoematologia della rete ospedaliera modenese, mentre gli stessi pazienti e più in generale tutti i pazienti in regime ambulatoriale, erano sottoposti a indagine con sTLC, creando una evidente discontinuità nel monitoraggio della malattia tra pazienti ospedalizzati e gli stessi una volta dimessi.

L'eliminazione di tutte metodiche effettuate in INA (uFLC, sTLC, uTLC) e l'integrazione della determinazione di alcune proteine sieriche sugli analizzatori ad elevata automazione, hanno consentito di dismettere il nefelometro Immage 800 recuperandone così il costo del canone annuo. A questo ha potuto fare seguito l'introduzione del turbidimetro Optilite, tecnologia altamente performante, per l'analisi delle sFLC, che ha consentito di automatizzare il lavoro e soprattutto di



**Figura 2**

*Sintesi dei costi per la diagnostica proteica negli anni interessati al cambiamento.*

*sELF+sIFE, elettroforesi sierica in tecnica capillare, immunotipizzazione e immunofissazione sierica; uFLC, catene leggere libere urinarie in immunonefelometria; uELF+uIFE, elettroforesi urinaria (uELF) e immunofissazione urinaria (uIFE); TLC (s-u), costi delle determinazioni di catene leggere totali sieriche e urinarie in immunonefelometria; proteine sieriche, determinazione in immunonefelometria di  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-glicoproteina acida, aptoglobina,  $\beta$ 2-microglobulina, lipoproteina-a; altro, materiale consumabile.*

garantire un elevato standard di qualità analitica del dato fornito. Lo strumento più produttivo ed efficiente, unito al risparmio complessivo di risorse generato dalla riorganizzazione, ha permesso di aumentare il numero di campioni da testare quotidianamente, rendendo disponibile la determinazione di sFLC a tutto il territorio provinciale.

L'aumento di oltre il 40% delle determinazioni di sFLC effettuate nel 2017 rispetto a quanto previsto, ha richiesto un approfondimento relativamente all'appropriatezza della richiesta. A tutti i medici, ospedalieri e del territorio, è stata divulgata una nota informativa riguardo all'introduzione dell'esame sFLC e del suo significato. Oltre a ciò per i medici di medicina generale è stato anche organizzato un incontro educativo sullo stesso tema sottolineando il valore clinico e l'uso appropriato dell'esame. Si è tuttavia ritenuto che l'incremento della richiesta delle sFLC fosse giustificato, almeno in parte, dal rientro nel sistema modenese dei pazienti affetti da GM che, una volta dimessi dai reparti di cura, per continuare il monitoraggio della patologia con sFLC, dovevano recarsi presso altri

laboratori sia delle Province limitrofe o rivolgersi a strutture private. L'estensione all'accesso alle sFLC ha reso possibile ai pazienti l'utilizzo di tutti i centri prelievi provinciali usufruendo di quelli più vicini alla loro abitazione. Si tratta di malati cronici e fragili con patologie altamente invalidanti, che talvolta provocano lesioni ossee e non consentono un'agevole mobilità (18,21). Permettere a questi pazienti di limitare gli spostamenti creando loro il minor disagio possibile, non è stata solo un'operazione di appropriatezza della offerta sanitaria, di adeguamento alle linee guida e alla "Best Practices Laboratory Medicine", ma anche una risposta ad un bisogno sociale e un'operazione di equità territoriale. Il controesodo spiega quindi l'aumento della richiesta di sFLC rispetto alle previsioni, evidenziando quanto fosse necessario ampliare l'offerta di tale esame nel territorio modenese.

## CONCLUSIONI

La risposta del governo sanitario alla necessità di contenimento dei costi del SSN è spesso l'adozione di

tagli lineari alla Sanità o nella migliore delle ipotesi la mancanza di ulteriori stanziamenti pur a fronte di una domanda di prestazioni sempre crescente anche in ragione dell'aumento dell'età media della popolazione (22). Per conciliare l'incremento della richiesta sanitaria intesa come prestazioni, tecnologie e impegno professionale, con il mantenimento – se non la diminuzione - delle risorse assegnate, è necessario attuare interventi di razionalizzazione che possono avvenire solo con un'attenta analisi dei processi, integrando l'aggiornamento tecnologico e scientifico con l'ottimizzazione organizzativa sia delle risorse umane che strumentali applicando un costante e continuo monitoraggio dei costi (23,24).

Strumento indispensabile per perseguire gli obiettivi indicati è l'approccio EBLM grazie al quale vengono individuate le prestazioni di più provata efficacia ed efficienza scientificamente validate (25,26).

Nella realtà modenese l'approccio EBLM applicato alla diagnostica proteica ha prodotto una maggiore accuratezza diagnostica, una razionalizzazione dei percorsi analitici, una riduzione dei tempi di risposta, un sensibile decremento dei costi che ha reso possibile la riallocazione delle risorse in altri ambiti della diagnostica di Laboratorio consentendo anche una risposta sociale alle istanze legittime dei cittadini. È utile sottolineare come fornire prestazioni di migliore qualità non necessariamente coincida con un aumento dei costi; al contrario, l'approccio EBLM aiuta ad individuare gli esami obsoleti, gli sprechi conseguenti e ad eliminarli (27). Le azioni di miglioramento non possono che essere una costante nell'organizzazione del laboratorio, pertanto quelli fin qui ottenuti non si possono ritenere risultati definitivi, ma solo una tappa di un processo di cambiamento continuo di cui il metodo EBLM, insieme alla aderenza alle linee guida disponibili, rappresenta uno dei pilastri portanti.

Il professionista di laboratorio, anche qualora si occupi di specifici e circoscritti campi di medicina di laboratorio, oltre a mantenere e sviluppare un adeguato livello di competenze scientifiche, deve acquisire abilità gestionali e manageriali per la necessità di introdurre diagnostiche aggiornate e performanti ottimizzando l'uso delle risorse assegnate.

Una prassi professionale utile a gestire gli interventi sanitari non può che basarsi sulle evidenze quale garanzia di efficacia, prestare attenzione alle esigenze dei cittadini e dei clinici, mostrare capacità gestionali per governare e promuovere il cambiamento scientifico e tecnologico. La formazione e l'aggiornamento continuo, non da ultimo l'utilizzo delle indicazioni delle Società Scientifiche, divengono strumenti indispensabili per mantenere elevato il livello dell'organizzazione sanitaria, e rendere al contempo percepibile il valore del professionista di laboratorio (28).

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Fontana F. Clinical governance: una prospettiva organizzativa e gestionale. Milano: Franco Angeli Editore, 2005.
- Chocane AL. Effectiveness and efficiency: random reflections on health services. London: The Nuffield Provincial Hospital Trust, 1972.
- Horvat AR. Quale evidenza abbiamo degli esami di laboratorio? Riv Med Lab. 2004;5:274-82.
- Terreni A, Caldini A, Graziani MS, et al. Valutazione dell'impatto delle raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC Proteine sull'operatività dei laboratori italiani. Biochim Clin 2015;39:585-90.
- Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK myeloma forum (UKMF) and nordic myeloma study group (NMSG): Guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). Br J Haematol 2009;147:22-42.
- Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. Leukemia 2014;28:981-92.
- 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.
- Natali P, Patelli G, Tagliavini S, et al. Accuratezza dell'immunonefelometria come metodo di screening per la determinazione della proteina di Bence Jones. Biochim Clin 2017;41:148-53.
- Tate J, Bazeley S, Sykes S, et al. Quantitative serum free light chain assay-analytical issues. Clin Biochem Rev 2009;30:131-40.
- Vercammen MJ, Broodtaerts L, Meirlaen P, et al. Overestimation of free light chain antigen excess rate. Clin Chim Acta 2015;444:297-302.
- Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. Clin Chem Lab Med 2003;41:338-46.
- Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood 2011;117:4701-5.
- Willrich MAV, Murray DL, Kyle RA. Laboratory testing for monoclonal gammopathies: Focus on monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Clin Biochem 2018;51:38-47.
- Vidali M, Tronchin M, Dittadi R. Protocollo per la comparazione di due metodi analitici di laboratorio. Biochim Clin 2016;40:129-42.
- Canali C, Giampaolo L, Tagliavini S, et al. Evaluation of the analytical performance of 5 immunoturbidimetric assay for specific serum proteins, comparison with immunonephelometry according to the SIBioC guidelines. Biochim Clin 2016;40(SS):S148-P224.
- Hungria VTM, Allen S, Kampanis P, et al. Serum free light chain assays not total light chain assays are the standard of care to assess Monoclonal Gammopathies. Rev Bras Hematol Hemoter 2016;38:37-43.
- Hungria VTM, Kampanis P, Drayson MT, et al. Comparison of kappa & lambda free light to total kappa & lambda immunoassays for the detection of monoclonal gammopathies, both as standalone tests and alongside serum protein electrophoresis. Blood 2014;124:5705.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol

- 2014;15:538-48.
19. Infusino I, Borille S, Panteghini M. Valutazione del sistema Optilite™ per la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero. *Biochim Clin* 2018;41:148-53.
  20. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
  21. Kyle RA, Rajkumar V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
  22. Mussap M. Il controllo della spesa nel laboratorio clinico: dall'emergenza dei tagli alla creazione di modelli di risparmio basati sul miglioramento delle cure. *Biochim Clin* 2013;37:287-91.
  23. Plebani M. Contenimento dei costi nel laboratorio clinico: razionamento o razionalizzazione? *Biochim Clin* 2016;40:123-8.
  24. Barletta G, Zaninotto M, Faggian D, et al. Shop for quality or quantity? Volumes and costs in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:295-301.
  25. Giavarina D. L'appropriatezza in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:609-16.
  26. Canali C, Trenti T. La Medicina di Laboratorio basata sull'evidenza: gli strumenti utili per una valutazione razionale degli esami di laboratorio. *Biochim Clin* 2008;32:243-50.
  27. Gulletta E, Gulletta G, Scuteri A. Appropriatezza nella richiesta di indagini diagnostiche. *Riv Med Lab* 2004;5:209-13.
  28. Ministero della Salute - Direzione Generale della programmazione sanitaria. La Formazione per il Governo Clinico. Roma; Dipartimento della programmazione e dell'ordinamento del Servizio Sanitario Nazionale. 2013.

## Disegno e sviluppo di una applicazione per dispositivi mobili per migliorare l'appropriatezza prescrittiva degli esami di laboratorio del medico di medicina generale: focus sull'ipertensione arteriosa

Valentina Pecoraro<sup>1</sup>, Luca Iaboli<sup>2</sup>, Francesca Borsari<sup>2</sup>, Claudio Cavalieri<sup>3</sup>, Margherita Di Pietro<sup>3</sup>, Andrea Roncaglia<sup>2</sup>, Stefania Togni<sup>3</sup>, Tommaso Trenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Tossicologia, Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

<sup>2</sup>Corso Formazione Specifica in Medicina Generale, Modena

<sup>3</sup>Medico di Medicina Generale, AUSL Modena

### ABSTRACT

**An application for mobile devices to improve the appropriateness of laboratory test request by general practitioners: focus on blood hypertension.** The prevalence of consultations of general practitioners (GPs) is huge, and for an unknown number of patients a consistent amount of diagnostic laboratory tests is requested. One of the tasks of GPs is to identify patients in need of specific laboratory tests, to improve the patient outcomes taking at the same time into consideration the risk of over-diagnosis and treatment and the available resources as well. To support GPs in their decisional process, we developed a dedicated software application (APP) for mobile devices; the APP contents were developed in collaboration with GPs, with students of a GP training course and with laboratory medicine specialists. We identified the laboratory tests useful for the management of the most frequent diseases observed in GPs' offices, that are supported by the best available evidence. The first attempt was made considering blood hypertension. Aim of the paper is the description of the process of the APP development, that includes data available from national and international guidelines. This promising tool could help GPs to prescribe suitable laboratory tests in different clinical scenario (diagnosis, evaluation of therapy, monitoring) and to promote the implementation of the evidence-based practice of laboratory medicine, reducing the requests of inappropriate tests and accurately identifying patients who need a second level referral (nephrologist, endocrinologist).

### INTRODUZIONE

In Italia, il 97% della popolazione adulta possiede un cellulare e il 76% uno smartphone (1). Nel 2017, il numero delle applicazioni (APPs) sviluppate per i dispositivi mobili (smartphone o tablet) è stato stimato essere il 57% di tutti i media digitali disponibili (2). Negli ultimi anni il numero di APPs dedicato al mondo della salute è notevolmente incrementato. Data la facilità di accesso a contenuti multimediali, la flessibilità di utilizzo e la possibilità di avere risposte rapide, le APPs sulla salute sono utilizzate dai pazienti per accedere a diverse tipologie di informazione clinica, nonché dai medici e dagli studenti come aggiornamento professionale e strumento di apprendimento. Le APPs sanitarie più utilizzate riguardano l'area chirurgica, la dermatologia, le malattie infettive, il diabete e il fumo (3).

Ogni anno negli Stati Uniti vengono eseguiti circa 7 miliardi di esami di laboratorio, fornendo una incommensurabile quantità di informazioni impattanti sulle decisioni diagnostiche e terapeutiche prese dai clinici (4); tuttavia, ad oggi le APPs dedicate agli esami di laboratorio risultano essere poco diffuse. D'altronde, in un'epoca in cui la medicina di laboratorio rappresenta l'1,8% della spesa sanitaria totale (5) e la richiesta di esami ha un incremento annuo di oltre il 5% (6), la medicina di laboratorio è sotto pressione per ridurre i costi ed eliminare gli sprechi mantenendo o migliorando gli standard di qualità. In questo contesto, una APP sviluppata in modo indipendente e con criteri di qualità, potrebbe diventare uno strumento potente per gestire l'utilizzo degli esami di laboratorio (7-8).

In Italia, una grossa quota delle richieste di esami diagnostici è prescritta dal medico di medicina generale

Corrispondenza a: Valentina Pecoraro, Laboratorio Tossicologia, Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata "Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica". Ospedale Civile S. Agostino Estense, Via Giardini 1355, 41126 Modena. Tel. +39 059 3961427; e-mail: valepecoraro@gmail.com

Ricevuto: 03.08.2018

Revisionato: 24.09.2018

Accettato: 25.09.2018

Pubblicato on-line: 26.11.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.68

(MMG). Mensilmente, circa il 10% (113/1000) dei pazienti che manifesta alcuni segni clinici ricorre al proprio medico (9), che prescrive l'esecuzione di esami di laboratorio in una percentuale di casi che non è facilmente stimabile. Gli esami di laboratorio sono utilizzati dal MMG in differenti contesti clinici: accertamenti ambulatoriali, diagnosi, sino al monitoraggio di patologie già diagnosticate. Al fine di migliorarne l'esito clinico, è di interesse del MMG definire quale esame sia utile/necessario ad un determinato paziente, tenendo in considerazione le risorse a disposizione. Le decisioni prese dal MMG sono in relazione alle proprie conoscenze, al tempo impiegato nell'aggiornamento e nel cercare informazioni valide e corrette relative a come un esame possa contribuire ad una adeguata gestione del paziente. L'uso inappropriato delle indagini di laboratorio, inteso sia come sovra- che sotto-utilizzo, comporta alcune conseguenze che vanno dall'eccessivo numero di prelievi sanguigni, all'incremento del numero di risultati falsi positivi responsabili di diagnosi errate ("over-diagnosis") e trattamenti non necessari ("over-treatment") oltre ad un considerevole aumento dei costi ma anche a diagnosi mancate o ritardate (sotto-utilizzo). Secondo alcune stime, il sovra-utilizzo degli esami di laboratorio si aggira sul 20%-25% (10). Riuscendo a ridurre la richiesta di esami inappropriati, si può ottenere una riduzione dei costi diretti e una riduzione della successiva cascata diagnostica e terapeutica. Infatti, riscontri accidentali privi di significato clinico o riscontri falsamente positivi (11) possono indurre alla ripetizione delle singole determinazioni o all'approfondimento mediante diagnostica per immagini, o anche alla prescrizione di terapie e/o interventi non necessari.

L'obiettivo di questo lavoro è esporre lo sviluppo di una APP, disegnata e realizzata per essere consultata dai MMG come strumento informativo nel percorso diagnostico-terapeutico e di monitoraggio dei loro pazienti. In particolare, saranno descritti lo sviluppo e i risultati riguardanti il capitolo dedicato all'ipertensione arteriosa. L'APP ha l'obiettivo di fornire ai MMG informazioni valide, basate sulle migliori evidenze disponibili, relative ai principali esami di laboratorio da prescrivere, considerando le caratteristiche cliniche dei pazienti.

## METODI

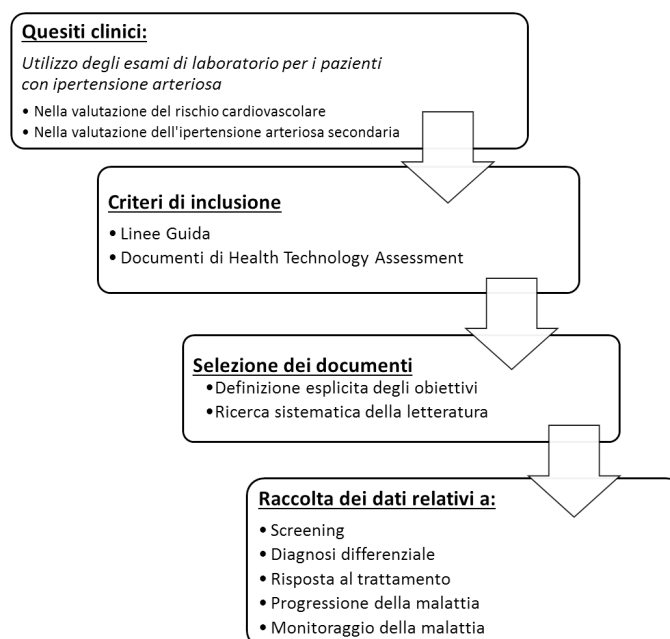
Lo sviluppo dei contenuti delle varie sezioni della APP segue il percorso strutturato e trasparente descritto qui di seguito (Figura 1). La metodologia utilizzata consente: di recuperare le migliori evidenze disponibili, di sintetizzare le informazioni contenute nei documenti recuperati e di rendere le indicazioni facilmente comprensibili e velocemente disponibili.

Relativamente all'argomento presentato in questo lavoro, sono stati affrontati due quesiti clinici:

- utilizzo degli esami di laboratorio nella valutazione del rischio cardiovascolare in pazienti affetti da ipertensione arteriosa;
- utilizzo degli esami di laboratorio in caso di sospetta ipertensione arteriosa secondaria.

### Criteri di inclusione dei documenti

Per lo sviluppo dei contenuti della APP, sono stati inclusi i documenti di letteratura secondaria, linee guida (LG) e documenti di "Health Technology Assessment"



**Figura 1**  
Percorso implementato per lo sviluppo dei contenuti della APP.

(HTA) prodotti con metodologia sistematica, con definizione esplicita degli obiettivi, presenza di un gruppo multidisciplinare e ricerca sistematica della letteratura con indicazione delle banche dati consultate. I documenti eleggibili, ma che non soddisfacevano almeno uno dei criteri indicati e che non riportavano le informazioni relative agli esami di laboratorio sono stati esclusi.

### Banche dati e siti consultati

La ricerca della letteratura, per tutte le sezioni della APP, è stata condotta consultando banche dati bibliografiche, siti di società scientifiche, agenzie ed organi regolatori nazionali ed internazionali.

Sono state consultate le seguenti fonti: PubMed, The Cochrane Library, National Guideline Clearinghouse (NGC), Guideline International Library, International Network of Agencies for Health Technology Assessment (INAHTA), The National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Agency for Healthcare and Quality (AHRQ), Società Italiana dell'ipertensione arteriosa, European Society of Hypertension, Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC). Sono stati inclusi documenti per i quali sono disponibili i testi completi e redatti in lingua italiana, inglese, spagnola pubblicati dal 2010 fino a luglio 2017.

### Estrazione dei dati

La metodologia comune a tutte le sezioni della APP prevede che dai documenti selezionati siano estrapolate le informazioni relative al tipo di esame diagnostico (ad esempio creatinina, colesterolo), alla popolazione di interesse (ad esempio adulti), alla patologia considerata (ipertensione arteriosa), e alla modalità di esecuzione dell'esame. I dati sono stati inseriti ed ordinati in tabelle di estrazione dedicate. Le informazioni reperite sono state tabulate in base al tipo di scenario clinico considerato: screening, diagnosi differenziale, risposta al trattamento, progressione, monitoraggio. Nei documenti selezionati sono state cercate le informazioni che potessero rispondere ai seguenti quesiti:

- l'uso dell'esame è raccomandato (o non raccomandato)?
- in quale tipologia di pazienti?
- l'esecuzione di un esame di laboratorio ha valore clinico indipendente o deve essere usato in associazione ad altre indagini diagnostiche?

## RISULTATI

### Ricerca della letteratura

La ricerca della letteratura relativa alla valutazione dei pazienti affetti da ipertensione arteriosa ha individuato 49 referenze bibliografiche. Quattro autori indipendentemente hanno valutato i risultati della ricerca bibliografica per l'inclusione sulla base delle informazioni contenute nel titolo e nel sommario, considerando la pertinenza del documento rispetto ai quesiti di ricerca.

Dalle 49 referenze, 14 sono state escluse perché non pertinenti. Dei rimanenti 35 documenti, sono stati recuperati e valutati i testi completi, e alla fine sono state inclusi 16 documenti che rispondevano ai criteri di inclusione (Tabella 1).

Tutti i documenti inclusi nella nostra valutazione riportano l'informazione relativa alla valutazione del rischio cardiovascolare. Nove LG riportano informazioni relative al sospetto di una possibile ipertensione secondaria.

### I contenuti della APP

Il MMG può accedere facilmente ai contenuti della APP cliccando sull'icona specifica presente sul suo cellulare, dopo averla scaricata ed installata correttamente. L'applicazione si compone di più sezioni dedicate ai principali temi della medicina di laboratorio: allergologia, amenorrea, anemia, autoimmunità, biomarcatori tumorali, diabete, dislipidemie, disturbi della coagulazione, gammopatie monoclonali, ipertensione arteriosa, malattie della tiroide, malattie epatiche, malattie renali, osteoporosi, scompenso cardiaco. Esiste anche una sezione dedicata alla diagnostica per immagini. Il medico ha la possibilità di selezionare l'argomento di interesse. La sezione descritta in questo lavoro è l'ipertensione arteriosa, una condizione clinica ampiamente diffusa nella popolazione che riveste un ruolo centrale come fattore di rischio per le malattie cardiovascolari e determina un importante impatto sui Sistemi Sanitari Nazionali in termini di costi e di risorse impiegate. Il laboratorio svolge un ruolo essenziale nella valutazione del rischio cardiovascolare e nel riconoscimento di forme secondarie di ipertensione, conseguenza di altre patologie.

La diagnosi di ipertensione arteriosa si ha quando i valori di pressione arteriosa, in almeno due successive misurazioni effettuate a distanza di tempo, risultano uguali o superiori a 140 mmHg per la sistolica e/o a 90 mmHg per la diastolica. Gli scenari che si possono presentare al MMG sono due: la valutazione del rischio cardiovascolare all'esordio o in monitoraggio, e la valutazione di una possibile ipertensione secondaria (Figura 2).

Tutti i documenti sono concordi nell'indicare, per i pazienti per i quali sia opportuno/necessario valutare il loro rischio cardiovascolare, la prescrizione del seguente pannello di indagini di laboratorio per evidenziare la presenza di dislipidemia, diabete e insufficienza o danno renale: glucosio, creatinina plasmatica, esame chimico-fisico delle urine. Documenti diversi indicano di eseguire anche: colesterolo totale (15 LG), colesterolo HDL e LDL (14 LG), trigliceridi (14 LG), sodio (12 LG) e potassio (14 LG). La determinazione dell'emocromo è indicata in otto documenti, quella dell'acido urico in sette documenti, e quella dell'albumina urinaria in sei documenti, mentre otto documenti indicano la determinazione dell'albumina urinaria solo in presenza di creatinina alterata. Per cui, in caso di ipertensione arteriosa all'esordio compariranno sullo schermo della APP i seguenti esami: glucosio,

**Tabella 1***Elenco delle referenze relative ai documenti inclusi nella valutazione*

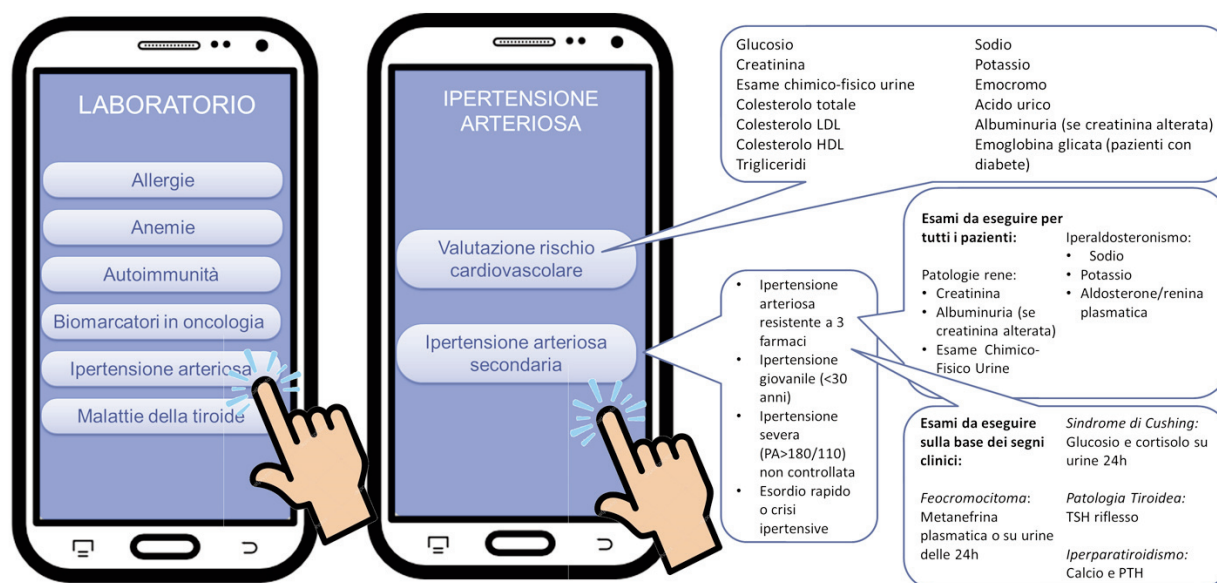
- 1 Leung A, Daskalopoulou S, Dasgupta K, et al. Hypertension Canada's 2017 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults. *Can J Cardiol*. 2017;33:557-76.
- 2 Abigail Valenzuela-Flores A, Solórzano-Santos F, Valenzuela-Flores AG, et al. Recomendaciones de la guía de práctica clínica de hipertensión arterial en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2016;54:249-60.
- 3 Guías de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial para el diagnóstico, estudio, tratamiento y seguimiento de la hipertensión arterial. 2016. <http://www.iashonline.org/wp-content/uploads/2016/11/Guia-SAHA-Full.pdf> (ultimo accesso: settembre 2018).
- 4 Malachias MVB, Neves MF, Mion D, et al. 7th Brazilian Guideline of arterial hypertension: chapter 3 – Clinical and complementary assessment. *Arq Bras Cardiol* 2016;107(3Suppl.3):1-83.
- 5 National Heart Foundation of Australia. Guideline for the diagnosis and management of hypertension in adults. 2016. Melbourne. [https://www.heartfoundation.org.au/images/uploads/publications/PRO-167\\_Hypertension-guideline-2016\\_WEB.pdf](https://www.heartfoundation.org.au/images/uploads/publications/PRO-167_Hypertension-guideline-2016_WEB.pdf) (ultimo accesso: settembre 2018)
- 6 NICE Clinical guideline CG127. Hypertension in adults: diagnosis and management. <https://www.nice.org.uk/guidance/Cg127> (ultimo accesso settembre 2018).
- 7 Lopez Jaramillo P, Molina de Salzar D, Zanchetti A. Manual practico LASH de diagnostico y manejo de la HTA en Latinoamerica. <http://www.iashonline.org/wp-content/uploads/2016/11/MANUAL-HTA-LASH-2015.pdf> (ultimo accesso: settembre 2018).
- 8 Ministerio de Salud. Republica del Peru. Guia Tecnica.: guia de practica clinica para el diagnostico, tratamiento y control de la enfermedad hipertensiva. [http://www.essalud.gob.pe/ietsi/pdfs/guias/bGuia\\_practica\\_clinica\\_para\\_diagnostico\\_tratamiento\\_control\\_de\\_enfermedad\\_hipertensiva.pdf](http://www.essalud.gob.pe/ietsi/pdfs/guias/bGuia_practica_clinica_para_diagnostico_tratamiento_control_de_enfermedad_hipertensiva.pdf) (ultimo accesso: settembre 2018).
- 9 Webera M, Schiffrinb E, White W, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community A Statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J Hypertens* 2014, 32:3-15.
- 10 Blacher J, Halimi JM, Hanon O, et al. Management of hypertension in adults: the 2013 French Society of Hypertension guidelines. *Fundam Clin Pharmacol* 2014;28: 1–9.
- 11 Seedat YK, Rayner BL, Veriava Y. South African hypertension practice guideline 2014. *Cardiovasc J Afr* 2014; 25: 288-94.
- 12 Shimamoto K, Ando K, Fujita T, et al. The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *Hypertens Res* 2014;37:253–392.
- 13 The Diagnosis and Management of Hypertension Working Group. VA/DoD Clinical practice guideline for the diagnosis and management of hypertension in the primary care setting. Department of Veterans Affairs, Department of Defense. Version 3.0 – 2014. <https://www.healthquality.va.gov/guidelines/CD/htn/VADoDCPGfortheManagementofHTN.pdf> (ultimo accesso: settembre 2018).
- 14 Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 2013; 34:2159–219.
- 15 Ministerio de Salud y Protección Social – Colciencias. Guía de práctica clínica. Hipertensión arterial temprana (HTA) - 2013 Guía No. 18. [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/GPC\\_Completa\\_HTA.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/GPC_Completa_HTA.pdf) (ultimo accesso: settembre 2018).
- 16 Mugelli A, Lenti S, Ungar A, et al. Iperensione arteriosa. Linea Guida Consiglio Sanitario Regionale, Regione Toscana. <http://www.regione.toscana.it/documents/10180/320308/iperensione+arteriosa/71716277-a77c-441c-8124-e6814a59c7e6> (ultimo accesso: settembre 2018).

colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL, trigliceridi, esame chimico-fisico delle urine, creatinina, sodio, potassio, emocromo, acido urico e albuminuria (Figura 2). Inoltre, nei pazienti con diabete, le LG consigliano anche la determinazione dell'emoglobina glicata, in aggiunta agli esami precedenti.

Un secondo scenario che si può presentare al MMG è il sospetto di un'ipertensione arteriosa secondaria, una forma di ipertensione con una causa sottostante potenzialmente correggibile, che ha una prevalenza nella popolazione adulta del 5%-10%. Una volta escluse dall'anamnesi cause iatrogene di ipertensione arteriosa (numerosi farmaci possono contribuire all'ipertensione arteriosa, tra questi: steroidi, estrogeni, antinfiammatori non steroidei), il MMG dovrebbe sospettare una ipertensione secondaria in un paziente con

un'ipertensione arteriosa resistente a tre farmaci, oppure in caso di ipertensione arteriosa severa (maggiore di 180/110 mmHg) non controllata, oppure in forme di ipertensione giovanile (<30 anni) o di ipertensione arteriosa ad esordio rapido o crisi ipertensive (Figura 2). L'etiologia può essere suggerita dai sintomi (ad esempio l'arrossamento del volto associato a sudorazione profusa può suggerire una diagnosi di feocromocitoma) e dai segni raccolti nel corso della visita medica (ad esempio una differenza di pressione arteriosa maggiore di 20 mmHg tra arti superiori e inferiori può suggerire una coartazione aortica). Anche in questi casi gli esami di laboratorio, insieme alla diagnostica per immagini, hanno un ruolo fondamentale per la conferma del sospetto diagnostico.

Nella APP gli esami di laboratorio necessari per fare



**Figura 2**

Esami di laboratorio raccomandati in pazienti con ipertensione arteriosa per la valutazione del rischio cardiovascolare o in pazienti con sospetto di ipertensione secondaria secondo i documenti consultati, come appaiono nella APP descritta.

diagnosi di ipertensione secondaria sono suddivisi in considerazione della probabilità a priori che il paziente, sulla base delle specifiche caratteristiche, sia affetto dalla condizione patologica sospettata. Le cause più frequenti di ipertensione secondaria sono la patologia del parenchima renale, la stenosi dell'arteria renale e l'iperaldosteronismo. I documenti inclusi nella nostra valutazione, indicano che in tutti i pazienti devono essere eseguiti i seguenti esami: creatinina, esame chimico-fisico delle urine e albumina urinaria (in caso di alterazione della creatinina) per una patologia nefrovascolare, e sodio, potassio con determinazione del rapporto aldosterone/renina plasmatica nel caso di sospetto iperaldosteronismo (Figura 2). Ulteriori esami di laboratorio saranno richiesti solo nel caso in cui i segni clinici suggeriscano patologie meno frequenti. Nel sospetto di feocromocitoma (ipertensione parossistica o crisi sovrapposte a ipertensione sostenuta, cefalea, sudorazione, rush, palpitazioni e pallore, ipotensione ortostatica) gli esami da eseguire sono metanefrina plasmatica o su urine delle 24 ore. Nel sospetto di sindrome di Cushing (rapido aumento di peso con obesità centrale, facies lunare, strie rubre, poliuria, polidipsia, disturbi psicologici) gli esami da eseguire sono glucosio e cortisolo su urine delle 24 ore. Nel sospetto di patologia tiroidea (bradicardia o tachicardia, intolleranza al caldo o freddo, costipazione o diarrea, ciclo mestruale irregolare) si dovrà determinare l'ormone tireostimolante (TSH). Calcio e paratormone (PTH) si richiederanno nel sospetto di iperparatiroidismo (Figura 2).

In aggiunta alle indicazioni relative agli esami da prescrivere, sarà disponibile al MMG una sezione in cui consultare la bibliografia dei documenti valutati.

## DISCUSSIONE

Diverse strategie sono state proposte per migliorare e modificare le richieste di esami diagnostici da parte dei clinici. Tra queste, uno degli strumenti più utilizzati sono i sistemi di supporto decisionali computerizzati ("computerized clinical decision support system" – CCDSS) che incrociano informazioni provenienti dalle evidenze con le caratteristiche dei pazienti. I CCDSS sviluppati per le indagini di laboratorio sembrano avere un effetto molto limitato sul miglioramento dell'esito clinico, ma possono migliorare il processo diagnostico e ridurre il numero degli esami ridondanti e, quindi, di quelli inappropriati (12).

Tra le altre strategie proposte per monitorare e migliorare l'appropriatezza degli esami prescritti, c'è lo sviluppo di algoritmi e percorsi clinici sviluppati in accordo con le principali LG nazionali ed internazionali (13).

Questo lavoro descrive il disegno e lo sviluppo di una APP per dispositivi mobili, pensata come una risorsa per il supporto alla decisione clinica basata sulle prove e destinata al MMG. Strumento di approfondimento facilmente consultabile, lo scopo della APP è quello di guidare il MMG nella scelta dell'esame diagnostico più utile ed appropriato da prescrivere al paziente durante la sua attività ambulatoriale quotidiana.

In questo lavoro ci siamo limitati a descrivere lo sviluppo delle informazioni contenute nel capitolo dedicato alla valutazione dei pazienti affetti da ipertensione arteriosa, sviluppato in modo da consentire al MMG di valutare separatamente per questi pazienti il rischio cardiovascolare o una possibile ipertensione secondaria. Cliccando su icone dedicate, al MMG sarà

disponibile immediatamente l'indicazione riguardo quale esame di laboratorio prescrivere al paziente (Figura 2).

I principali vantaggi di questa APP sono: la funzionalità di un unico strumento contenente le informazioni relative a molteplici patologie, la praticità di avere gli esami catalogati considerando diversi tipi di scenari clinici, l'affidabilità delle indicazioni contenute che sono basate sulle migliori evidenze disponibili e sono sempre aggiornate, la facilità di accesso e di consultazione delle informazioni.

Accanto a questo strumento pensato per migliorare l'appropriatezza della scelta degli esami di laboratorio, il clinico necessita anche di una varietà di informazioni circa l'esame. Queste informazioni possono includere consigli interpretativi, interferenze, cause di falsi positivi o falsi negativi, istruzioni sulla corretta modalità di raccolta e così via. Per facilitare la rapida consultazione di queste informazioni, alla APP sarà prossimamente collegato il sito "Lab Tests Online" (14) che descrive più di 300 esami di laboratorio ed oltre 100 malattie. La versione italiana di questo sito nasce dalla collaborazione tra l'American Association of Clinical Chemistry (AACC) che lo ha sviluppato, e SIBioC che ne cura la traduzione, con l'obiettivo di collegare le informazioni relative agli esami di laboratorio alle patologie per suggerire *"l'esame giusto per il paziente giusto, da richiedere per il quesito appropriato ed al momento appropriato"* (14).

In un tempo in cui la complessità del sistema di cura aumenta esponenzialmente, emerge sempre più evidentemente il rischio del paziente di esporsi a cascate diagnostiche inutili e pericolose, con conseguente frustrazione per il mancato raggiungimento dell'obiettivo, che ingenera conflitti e appesantisce situazioni di fragilità. A questo si aggiunge poi il rischio che l'utente non riesca efficientemente ad ottenere la prestazione richiesta a causa di carenze organizzative e formative. Infatti, da una parte si fa strada la medicina difensiva per cui i medici prescrivono più esami di quelli necessari a scopo cautelativo, dall'altra a volte risulta essere necessario ripetere alcuni esami a causa di risultati incerti. Inoltre al MMG è richiesto un aggiornamento costante con un importante investimento in termini di tempo, con la contemporanea necessità di una difficoltosa gestione dei pazienti complessi che richiede l'interazione di più specialisti.

In questo spaccato, la figura del MMG si delinea come essenziale per l'utente, per la sua posizione di duplice vicinanza e facile reperibilità sia dall'utente che dagli altri livelli del sistema di cura, che gli consente di essere guida per l'utente e riferimento per gli altri professionisti. Per lavorare efficacemente ed efficientemente è necessario che i percorsi diagnostico-terapeutico-assistenziali locali e non, siano di pronta reperibilità per essere somministrati all'utente, e considerata la mole di tali informazioni, riteniamo che la nostra APP possa fornire un adeguato supporto facile all'uso.

## CONCLUSIONI

Questo progetto nasce da due necessità, quella dei MMG di prescrivere l'esame giusto al paziente giusto con l'intento di migliorarne l'esito clinico e fornire un servizio di assistenza appropriato, e quella dei professionisti di laboratorio di ridurre il numero di richieste inappropriate che si traducono nell'impiego di personale e di risorse per soddisfare questa tipologia di richieste con conseguente aumento dei costi.

Nello sforzo di assicurare l'esame appropriato alla necessità del paziente, questo dispositivo informatico è uno strumento per supportare la decisione nel contesto di una pratica clinica sempre più complessa con tempi sempre più contingentati. Lo sviluppo di questa APP per dispositivi mobili sembra essere promettente e può contribuire ad implementare le buone pratiche quotidiane di medicina di laboratorio, riducendo il numero di richieste di esami di laboratorio inappropriati e identificare i pazienti per i quali si rende necessario un consulto ad un livello di specialità superiore.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Digital in 2018 Report. <https://wearesocial.com/it/blog/2018/01/global-digital-report-2018>. (ultimo accesso: giugno 2018).
2. Lipsman A, Lella A. The 2017 US Mobile App Report 2017 <https://www.comscore.com/Insights/Presentations-and-Whitepapers/2017/The-2017-US-Mobile-App-Report>. (ultimo accesso: giugno 2018).
3. Kiser K. 25 ways to use your smartphone. Physicians share their favorite uses and apps. *Min Med* 2011;94:22-9.
4. <http://www.acla.com/value-of-lab-testing/> (ultimo accesso: giugno 2018).
5. Lord Carter of Coles. Report of the second phase of the review of NHS pathology services in England. 2008. [http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130124044941/http://www.dh.gov.uk/prod\\_consum\\_dh/groups/dh\\_digit\\_assets/@dh/@en/documents/digitalasset/dh\\_091984.pdf](http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20130124044941/http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digit_assets/@dh/@en/documents/digitalasset/dh_091984.pdf). (ultimo accesso: giugno 2018).
6. State of Health in the European Union. European Commission, Public Health Web site. [http://ec.europa.eu/health/reports/european/statistics/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/reports/european/statistics/index_en.htm). (ultimo accesso: giugno 2018).
7. Cadogan S, Colin J, Bradley C, et al. The effectiveness of interventions to improve laboratory requesting patterns among primary care physicians: a systematic review. *Implement Sci* 2015;10:167.
8. Baron JM, Dighe AS. The role of informatics and decision support in utilization management. *Clin Chim Acta* 2014; 427:196-201.
9. Green LA, Fryer GE Jr, Yawn BP, et al. The ecology of medical care revisited. *N Engl J Med* 2001;344:2021-5.
10. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, et al. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e78962.

11. Koch H, van Bokhoven MA, ter Riet G, et al. Ordering blood tests for patients with unexplained fatigue in general practice: what does it yield? Results of the VAMPIRE trial. *Br J Gen Pract* 2009; 59:e93-e100.
12. 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.
13. Ferraro S, Panteghini M. The role of laboratory in ensuring appropriate test requests. *Clin Biochem* 2017;50:555-61.
14. <https://www.labtestsonline.it/>

## Importanza dell'utilizzo di Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist nel disegno sperimentale di studi di variabilità biologica. Valutazione a confronto di due pubblicazioni sulla variabilità biologica della proteina S100-β e dell'enzolasi neurone specifica

Giulia Cajano<sup>1</sup>, Elena Guerra<sup>1</sup>, Massimo Locatelli<sup>1</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>2</sup>, Jorge Díaz-Garzón Marco<sup>3,4</sup>, Pilar Fernández-Calle<sup>3,4</sup>, Joana Minchinela<sup>3,5</sup>, Aasne K. Aarsand<sup>6,7</sup>, Bartlett W<sup>8</sup>, Berna Aslan<sup>9</sup>, Beatriz Boned<sup>3,10</sup>, Zoraida Corte<sup>3,11</sup>, Abdurrahman Coskun<sup>12</sup>, Elisabet Gonzalez-Lao<sup>3,13</sup>, Niels Jonker<sup>14</sup>, Fernando Marques-Garcia<sup>3,15</sup>, Carmen Perich<sup>3,16</sup>, Carmen Ricos<sup>3</sup>, Margarita Simón<sup>3,18</sup>, Sverre Sandberg<sup>6,7,19</sup>, Anna Carobene<sup>1</sup>, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group on Biological Variation and Task Group for the Biological Variation Database

<sup>1</sup>Servizio Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

<sup>2</sup>Laboratorio di Chimica Clinica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>3</sup>Analytical Quality Commission, Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQCML)

<sup>4</sup>Department of Laboratory Medicine, La Paz University Hospital, Madrid, Spagna

<sup>5</sup>Metropolitana Nord Clinical Laboratory (LCMN), Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spagna

<sup>6</sup>Norwegian Porphyria Centre, Laboratory of Clinical Biochemistry, Haukeland University Hospital, Bergen, Norvegia

<sup>7</sup>Norwegian Quality Improvement of Laboratory Examinations (NOKLUS), Haralds plass Deaconess Hospital, Bergen, Norvegia

<sup>8</sup>Blood Sciences, Ninewells Hospital & Medical School, Scotland, Regno Unito

<sup>9</sup>Institute for Quality Management in Healthcare (IQMH), Centre for Proficiency Testing, Toronto, Ontario, Canada

<sup>10</sup>Royo Villanova Hospital, Zaragoza, Spagna

<sup>11</sup>San Agustin University Hospital, Aviles, Asturias, Spagna

<sup>12</sup>Acibadem University, School of Medicine, Atasehir, Istanbul, Turchia

<sup>13</sup>Quality Healthcare Consulting. Grupo ACMS, Madrid, Spagna

<sup>14</sup>Certe, Wilhelmina Ziekenhuis Assen, Assen, Olanda

<sup>15</sup>Department of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Spagna

<sup>16</sup>Clinic Laboratory Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spagna

<sup>18</sup>Laboratory de l'Alt Penedés, l'Anoia i el Garraf, Barcelona, Spagna

<sup>19</sup>Department of Global Health and Primary Care, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Bergen, Norvegia

### ABSTRACT

**The importance of the Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist when designing experimental studies on biological variation. Comparison of two papers reporting biological variation results for S100-β and neuron-specific enolase proteins.** The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist (BIVAC) has been designed to evaluate biological variation (BV) studies and the reliability of the associated BV estimates. To illustrate its utility, two studies delivering within-subject BV (CV<sub>i</sub>) data for S100-β protein and neuron-specific enolase (NSE), markers typically used for melanoma and neuroendocrine tumors, respectively, were appraised using BIVAC. Data from the European Biological Variation Study (EuBIVAS) and the recently published Johnson et al. study (ref n 11) were scored using the 14 BIVAC quality items (QI), with alternatives A, B, C and/or D to verify whether the elements required to obtain reliable BV data, were present and appropriately documented. Grade A indicates compliance with all the QIs and D indicates non compliance. The sizes of the confidence interval (CI) around the CV<sub>i</sub> estimates were also compared. Johnson's study received a BIVAC grade C, EuBIVAS a grade A. EuBIVAS is a large scale study, with

*\*Questi risultati sono stati parzialmente pubblicati in forma di lettera all'Editore su Clinical Chemistry [Clin Chem 2018;64:1537-8]*

Corrispondenza a: Anna Carobene, Servizio Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano. e-mail: carobene.anna@hsr.it

Ricevuto: 28.09.2018

Revisionato: 31.10.2018

Accettato: 09.11.2018

Pubblicato on-line: 14.01.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.001

1609 and 1728 results for NSE and S100- $\beta$ , respectively. In Johnson's study, only 40 results were available. The EuBIVAS CV<sub>1</sub> estimates [NSE, 10.9% (10.3-11.5); S100- $\beta$ , 10.2% (9.6-10.7)] were clearly lower than Johnson's CV<sub>1</sub>s [NSE, 22.1% (9.9-34.3); S100- $\beta$ , 18.9% (8.5-29.4)]. The overlapping C<sub>1</sub> between the two estimates are caused by Johnson's CI being about 20 times larger than the corresponding EuBIVAS CI. It is likely that studies that do not comply with all BIVAC QI deliver less reliable, and possibly too high, CVI estimates. Adherence to the BIVAC ensures safe clinical application of BV estimates.

## INTRODUZIONE

I dati di variabilità biologica (VB) sono utilizzati per diverse applicazioni, principalmente per la definizione delle specifiche di qualità analitica ("analytical performance specification", APS) per la diagnosi e per il monitoraggio delle malattie attraverso l'uso dei dati di differenza critica (DC) (1).

Attualmente la principale fonte di dati di VB è il database on line disponibile nel sito di Westgard (2) che fino al 2014 è stato aggiornato periodicamente ogni due anni (3). In questo database è possibile consultare i valori di variabilità biologica intra (CV<sub>I</sub>) ed inter-individuale (CV<sub>G</sub>) di oltre 350 misurandi, e le APS derivate per l'imprecisione, il bias e l'errore totale.

Negli ultimi anni però, alcune pubblicazioni scientifiche hanno evidenziato i limiti di alcuni dati di VB, sottolineandone la non affidabilità (4-7). La maggior parte dei dati di VB attualmente disponibili, derivano da un numero limitato di pubblicazioni scientifiche, spesso con disegni sperimentali non adeguati, con grande eterogeneità delle popolazioni studiate in termini di età, genere, stato di salute, stato stazionario ("steady-state"). Inoltre le pubblicazioni di VB spesso sono molto datate con la inevitabile conseguenza che i metodi analitici utilizzati sono spesso obsoleti. Infine, evidenti limiti sono stati riscontrati nell'analisi statistica dei dati (4-7).

Uno degli obiettivi del gruppo di lavoro di EFLM sul nuovo database di VB, gruppo nato in seguito alla prima conferenza strategica di EFLM tenutasi a Milano nel 2014 (8), è stato quello di realizzare una lista di controllo "The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist" (BIVAC) (9) che ha lo scopo di verificare se le pubblicazioni scientifiche contengano tutti gli elementi necessari per produrre dati di VB affidabili. BIVAC comprende 14 parametri di qualità, ed il suo utilizzo permette di classificare uno studio come A, B, C o D in accordo con il grado di qualità che viene attribuito ad ognuna delle 14 voci considerate (9). BIVAC, oltre ad essere uno strumento utile per valutare la qualità dei dati di VB già pubblicati, deve essere utilizzata anche come strumento per la generazione di nuovi dati di VB, in modo che siano conformi ad un approccio standardizzato, propriamente documentato, con un adeguato potere statistico.

In questo lavoro presentiamo i risultati del progetto Europeo di VB "European Biological Variation Study" (EuBIVAS) per la proteina S100- $\beta$  e per la enolasi neurone specifica (NSE) di recente pubblicazione (10), confrontandoli con altri dati di VB pubblicati da Johnson

et al, ottenuti su una popolazione di atleti amatori di arti marziali (11). La NSE e l'S100- $\beta$  sono utilizzate rispettivamente come marcatori nella diagnosi e nel monitoraggio dei tumori secernenti e nel melanoma, e nella diagnosi di danni cerebrali dovuti a traumi e a malattie neurologiche (10).

I due studi EuBIVAS (10) e Johnson et al. (11) sono stati pubblicati entrambi dopo BIVAC (9), e pertanto avrebbero dovuto essere stati disegnati tenendone conto. Lo scopo di questo lavoro è quindi quello di illustrare l'importanza che gli studi di BV siano disegnati in conformità alle raccomandazioni indicate in BIVAC, per assicurarne la validità dei risultati.

## METODI

### EuBIVAS

#### *Raccolta e trattamento dei campioni*

Le caratteristiche di EuBIVAS, sono descritte in dettaglio da Carobene et al. (12). Brevemente, EuBIVAS coinvolge sei laboratori europei di cui due in Italia, e uno rispettivamente in Norvegia, Spagna, Olanda e Turchia. I volontari hanno completato un questionario di arruolamento con informazioni sullo stile di vita e sullo stato di salute che è stato ulteriormente verificato mediante alcuni esami di laboratorio (12, 13-16). I laboratori coinvolti hanno seguito un unico protocollo dettagliato in ogni aspetto della fase pre-analitica. I campioni sono stati raccolti settimanalmente in 91 volontari sani a digiuno (53 femmine, 38 maschi, 21-69 anni) per 10 settimane consecutive tra aprile e giugno 2015 (12). Le principali caratteristiche dei soggetti arruolati sono mostrate nella Tabella 1.

I campioni raccolti da ogni laboratorio sono stati spediti in ghiaccio secco al centro coordinatore, Ospedale San Raffaele (OSR), Milano, dove sono stati conservati in un congelatore dedicato a -80°C fino al momento delle analisi (febbraio 2018). Il protocollo EuBIVAS è stato approvato dal comitato etico di OSR in accordo con la dichiarazione di Helsinki e dai comitati etici di tutti i centri europei coinvolti nella raccolta dei campioni.

I campioni sono stati misurati su Cobas Roche 6000, modulo e801, metodo in elettrochemiluminescenza con reattivi, calibratori e materiali di controllo Roche a due livelli di concentrazione. Contestualmente alle analisi di NSE e S100- $\beta$ , sono stati analizzati anche gli indici di siero per emolisi, considerando che in presenza di emolisi si libera nel siero enolasi eritrocitaria che

**Tabella 1**

Numero, sesso, età e indice di massa corporea (IMC) dei soggetti arruolati nel progetto europeo sulla variabilità biologica (EuBIVAS)

	Maschi (20-60 anni)	Età (anni): mediana e intervallo min-max	IMC (kg/m <sup>2</sup> ): mediana e intervallo min-max	Femmine (20-50 anni)	Età (anni): mediana e intervallo min-max	IMC (kg/m <sup>2</sup> ): mediana e intervallo min-max	Femmine (50-70 anni)	Età (anni): mediana e intervallo min-max	IMC (kg/m <sup>2</sup> ): mediana e intervallo min-max
Italia-MI (19 soggetti)	9	38 (24-59)	25,2 (20,8-30,0)	7	34 (24-48)	22,7 (17,6-23,9)	3	58 (55-59)	22,8 (19,4-27,5)
Italia-PD (14 soggetti)	5	32 (27-35)	22,5 (19,0-23,5)	8	33 (27-49)	19,8 (18,7-23,2)	1	69	69 18,6
Norvegia (15 soggetti)	7	37 (28-42)	24,3 (18,7-26,9)	6	43 (32-48)	21,7 (18,7-24,4)	2	63 (63-63)	24,6 (23,7-25,5)
Olanda (12 soggetti)	4	36 (23-45)	24,0 (18,1-26,3)	6	39 (29-49)	21,7 (20,9-24,2)	2	60 (59-60)	23,0 (20,7-25,3)
Spagna (16 soggetti)	7	34 (26-54)	25,1 (19,5-32,5)	7	26 (24-48)	21,7 (17,9-23,1)	2	60 (60-60)	21,3 (21,2-21,4)
Turchia (15 soggetti)	6	27 (22-35)	27,5 (22,2-29,9)	9	33 (21-38)	21,2 (18,3-27,3)	/	/	/
Totale (91 soggetti)	38	35 (22-59)	24,4 (18,1-32,5)	43	34 (21-49)	21,3 (17,6-27,3)	10	60 (55-69)	22,1 (18,6-27,5)

MI, centro di raccolta Milano; PD, centro di raccolta Padova; IMC, indice di massa corporea.

interferisce con la determinazione di NSE, incrementandone falsamente la concentrazione. Tutti i campioni dello stesso partecipante sono stati analizzati in duplicato nella stessa serie analitica.

#### Analisi statistica dei dati

Le stime di CV<sub>I</sub> sono state ottenute utilizzando la CV-ANOVA, un metodo di analisi della varianza, procedura non parametrica di recente pubblicazione che utilizza dati che sono già stati normalizzati e trasformati in CV% (17). L'elaborazione statistica dei dati è stata eseguita in conformità alle liste di controllo di recente pubblicazione (18-19).

Prima del calcolo delle stime di VB attraverso la CV-ANOVA, come raccomandato dalla lista di controllo di EFLM (18), sono stati effettuati l'identificazione e la rimozione degli outliers sia tra replicati sia tra campioni, la verifica della omogeneità delle varianze, lo studio della normalità e la verifica dello stato stazionario. In particolare, l'omogeneità dei CV<sub>A</sub> (tra replicati) è stata esaminata utilizzando il test di Bartlett (20) e dei CV<sub>I</sub> con il test di Cochran (21), mentre per la verifica della normalità dei residui è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk (22). Al fine di esaminare lo stato stazionario dei partecipanti, è stata calcolata la regressione lineare tra i valori medi delle concentrazioni dei dieci campioni ottenuti da tutti i partecipanti sia per NSE sia per S100-β. I partecipanti sono considerati in stato stazionario se l'intervallo di confidenza al 95% della pendenza della retta di regressione include lo 0.

I CV<sub>I</sub> sono stati calcolati per tutti i partecipanti, per i sottogruppi maschi, femmine e per gruppi di età ≤30 anni (n=22) e >30 anni. Gli intervalli di confidenza (IC) al 95% sono stati calcolati come descritto da Sahai et al. (23); la non sovrapposizione tra gli IC delle stime di CV<sub>I</sub> e di CV<sub>G</sub> dei singoli sottogruppi è stata utilizzata per valutare

l'eventuale significatività delle differenze.

Le stime di CV<sub>G</sub> sono state ottenute tramite ANOVA sui dati trasformati logaritmicamente dopo aver applicato il test di Dixon (24) per identificare la presenza di dati aberranti tra individui, e il test di Shapiro-Wilk per verificarne la normalità di distribuzione (22). Eventuali differenze tra soggetti provenienti dai diversi centri coinvolti sono state valutate visivamente.

Per il calcolo delle APS per l'imprecisione (CV<sub>APS</sub>) e il bias analitico (B<sub>APS</sub>) sono state utilizzate le seguenti formule:

$$CV_{APS} = \frac{1}{2} CV_I$$

$$B_{APS} = 0,25 \sqrt{(CV_I^2 + CV_G^2)}$$

Le DC sono state calcolate utilizzando l'approccio logaritmico normale come mostrato di seguito:

$$DS_{A,\log}^2 = \log_e(CV_A^2 + 1)$$

$$DS_{I,\log}^2 = \log_e(CV_I^2 + 1)$$

$$DS_{\text{combinata},\log}^* = \sqrt{DS_{A,\log}^2 + DS_{I,\log}^2}$$

$$DC\% = 100\% \times (e^{(\pm Z_{\alpha} \times \sqrt{2} \times DS_{\text{combinata},\log}^*)} - 1)$$

Dove DS<sub>A,log</sub> è la deviazione standard analitica (DS<sub>A</sub>) basata sulla retro-trasformazione logaritmica delle stime di CV<sub>A</sub> ottenute dalle misure in duplicato dei campioni in studio da tutti i partecipanti, la DS<sub>A,log</sub> è la DS intra-individuale basata sulle stime di CV<sub>I</sub> e la DS\* la combinazione delle due (17), per Z<sub>α</sub> = 1,65 per un livello di probabilità di cambiamento unidirezionale ad una probabilità del 95%.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando Excel 2010 e IBM SPSS statistica, versione 23.

## BIVAC

### *Utilizzo della lista di controllo e calcolo del peso delle stime di VB per la meta-analisi*

Il livello di qualità dei risultati EuBIVAS qui presentati, e quelli ottenuti da Johnson et al. (11) sia per NSE sia per S100- $\beta$  è stato valutato in accordo con i 14 parametri di qualità della lista di controllo BIVAC (9, 25), ed è mostrato nella Tabella 2. Un lavoro è considerato di qualità A (ottima qualità) se tutte le 14 voci sono classificate A (pienamente rispondenti ai criteri di qualità), viene considerato di classe B (buona qualità) anche se una sola voce su 14 è risultata B, come C (sufficiente) anche per una sola voce giudicata tale, e come D (inaccettabile) anche per una sola voce che viene giudicata come tale (9, 25).

Il grado di qualità attribuito ai due studi valutati, e l'inverso dell'ampiezza di IC intorno ai dati, che è il migliore indice della variabilità delle stime di VB, sono utilizzati per calcolare il peso che i risultati ottenuti dai due studi avranno nella meta-analisi di calcolo per le nuove stime di VB (9, 25).

## RISULTATI

### EuBIVAS

Per tutta la durata dello studio non è stata trovata una tendenza significativa di concentrazione per entrambe le proteine, garantendo lo stato stazionario della popolazione in esame. Le distribuzioni dei residui delle variazioni dei soggetti, verificate con il test di Shapiro-Wilk (22), sono risultate normali.

Per entrambe le proteine non sono state evidenziate differenze significative tra i sessi e i gruppi di età considerati. L'indice di emolisi è risultato essere >15 (emoglobina libera ~150 mg/L) nel 4% dei campioni che sono stati quindi eliminati dal calcolo delle stime di VB per la NSE. L'analisi delle omogeneità delle varianze analitiche e intra-individuali ha evidenziato il 2,4% dei

risultati da escludere per la S100- $\beta$  e un ulteriore 5,2% per la NSE (dato che comprende due soggetti completi, che sono stati eliminati per l'omogeneità delle varianze). I numeri complessivi dei risultati utilizzati, dopo eliminazione dei dati aberranti, per ottenere le stime di VB, sono mostrati nella Tabella 2 e paragonati ai numeri utilizzati nello studio di Johnson et al (11).

Le Figure 1 e 2 mostrano i risultati ottenuti in termini di concentrazione, rispettivamente per NSE e S100- $\beta$ , ordinati per sesso ed età.

Le stime di VB ottenute dalla popolazione EuBIVAS sono confrontate in Tabella 3 con quelle ottenute dallo studio di Johnson et al. (11). I valori EuBIVAS di CV, sono inferiori rispetto a quelli ottenuti da Johnson et al., ma considerando la sovrapposizione dei rispettivi IC non possiamo concludere che siano tra di loro statisticamente diversi.

## BIVAC

### *Valutazione delle pubblicazioni EuBIVAS e Johnson et al.*

Nella Tabella 4 sono paragonati i risultati ottenuti dalle valutazioni delle stime di VB ottenute da EuBIVAS e da Johnson et al. (11), per tutti i 14 indicatori di qualità, e in accordo con BIVAC, la spiegazione della valutazione del singolo QI se diverso dall'ottimale (9). Il punteggio complessivo di qualità attribuito ai dati ottenuti dallo studio EuBIVAS è risultato A, cioè di ottima qualità perché pienamente rispondente ai 14 quesiti. Il punteggio complessivo dello studio di Johnson et al. (11), è invece pari a C (qualità sufficiente), dovuto alla valutazione C data agli indicatori QI 7 ("steady state"), QI 8 (outliers), QI 12 (limiti di confidenza) e QI 13 (numero dei risultati inclusi) (Tabella 4).

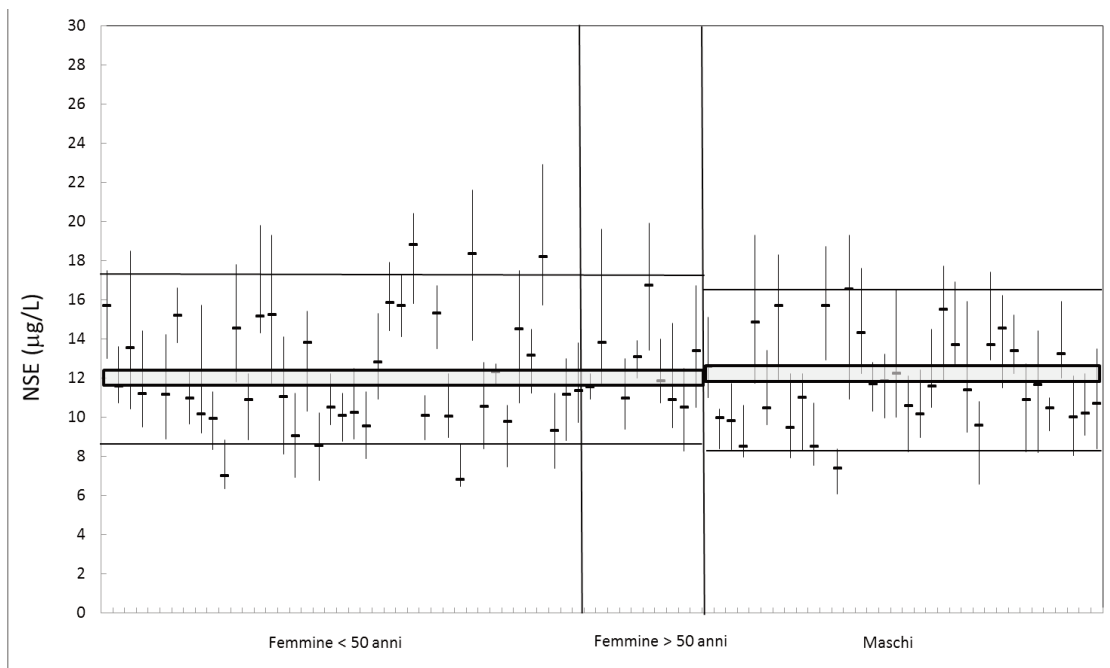
## DISCUSSIONE

Come mostrato nella Tabella 3, gli IC intorno alle stime dei valori di VB indicate da Johnson et al., sono

**Tabella 2**

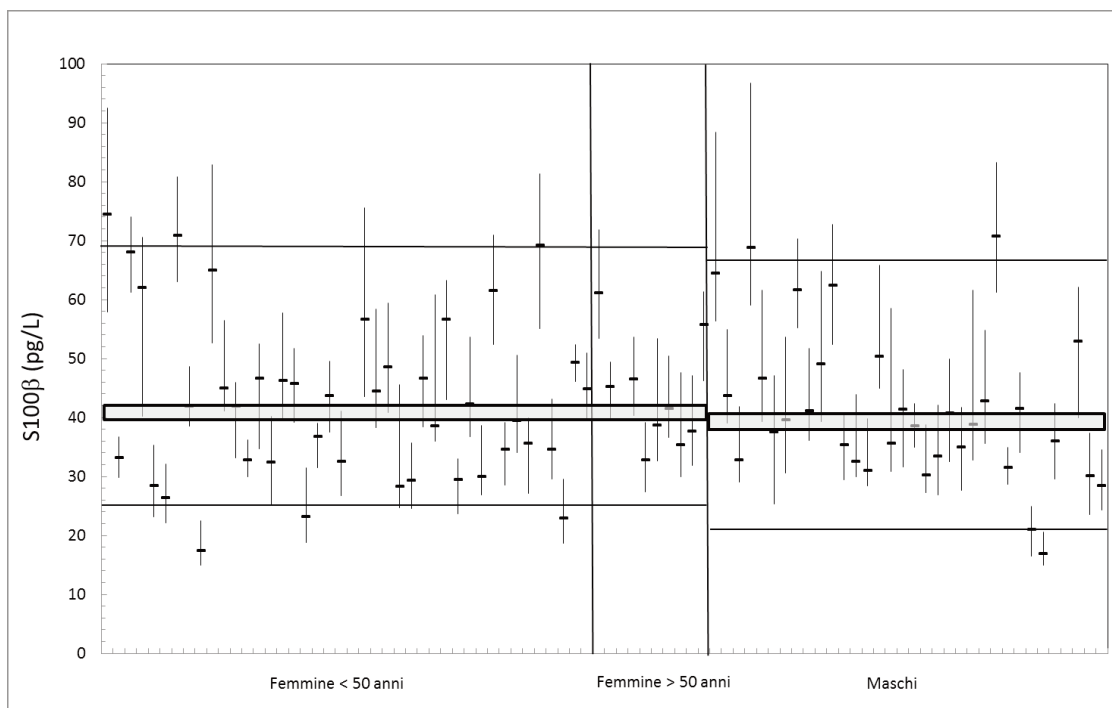
*Numero di individui e totale dei risultati utilizzati degli studi EuBIVAS (10) e Johnson et al. (11), per calcolare le stime di variabilità biologica per l'enolasi neurone-specifica (NSE) e la proteina S100- $\beta$ .*

		Numero e sesso degli individui	Numero totale di risultati	Media numero di campioni/ individuo	Media numero di replicati/ campione
NSE ( $\mu\text{g/L}$ )	EuBIVAS	89 (37 maschi, 52 femmine)	1609	9,07	1,99
	Johnson et al.	10 (sesso non dichiarato)	40	4	1
S100- $\beta$ (pg/L)	EuBIVAS	91 (38 maschi, 53 femmine)	1728	9,62	1,95
	Johnson et al.	10 (sesso non dichiarato)	40	4	1

**Figura 1**

Variabilità biologica di enolasi neurone specifica (NSE)

Valore minimo, massimo e mediano (trattino) per ogni soggetto, ordinati per sesso ed età. Le linee continue indicano rispettivamente il 5° e il 95° percentile e il valore mediano ( $\pm$  l'intervallo di confidenza) per i sottogruppi.

**Figura 2**

Variabilità biologica di S100- $\beta$  suddivisa per sesso ed età.

Valore minimo, massimo e mediano (trattino) per ogni soggetto, ordinati per sesso ed età. Le linee continue indicano rispettivamente il 5° e il 95° percentile e il valore mediano ( $\pm$  l'intervallo di confidenza) per i sottogruppi

**Tabella 3**

Stime di variabilità biologica (VB) intra- ( $CV_I$ ) ed inter-individuale ( $CV_G$ ) con i rispettivi intervalli di confidenza (IC) al 95% per NSE e S100- $\beta$  degli studi EuBIVAS (10) e Johnson et al. (11)

		Valore medio (IC <sub>95%</sub> )	CV <sub>A</sub> % <sup>1</sup> (IC <sub>95%</sub> )	CV <sub>I</sub> % (IC <sub>95%</sub> )	CV <sub>G</sub> % (IC <sub>95%</sub> )	DC % riduzione/ aumento
NSE ( $\mu\text{g/L}$ )	EuBIVAS	11,9 (11,8-12,1)	3,21 (3,0-3,4)	10,9 (10,3-11,5)	20,3 (18,0-24,6)	-23,2/30,2 <sup>2</sup>
	Johnson et al.	14,2	2,9	22,1 (9,9-34,3)	-	-54,1/54,1 <sup>3</sup>
S100- $\beta$ (pg/L)	EuBIVAS	44,5 (43,7-45,4)	4,3 (4,1-4,6)	10,2 (9,6-10,7)	32,7 (28,1-38,6)	-22,7/29,3 <sup>2</sup>
	Johnson et al.	48	1,0	18,9 (8,5-29,4)	-	-44,1/44,1 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Per EuBIVAS i valori di variabilità analitica ( $CV_A$ ) sono stati calcolati sui replicati per tutti i campioni dello studio, mentre nello studio di Johnson et al. sull'analisi dei materiali di controllo interno forniti dal produttore.

<sup>2</sup>I valori di differenza critica (DC) sono stati calcolati fornendo valori asimmetrici di aumento e diminuzione al livello di probabilità del 95% per cambiamenti unidirezionali significativi, applicando un  $CV_A$  calcolato sulla misura in duplicato di tutti i campioni dello studio.

<sup>3</sup>I valori di differenza critica (DC) sono stati calcolati con la formula:  $Z_{\alpha} \sqrt{2(CV_I^2 + CV_A^{2,0.5})}$ .

**Tabella 4**

Risultati ottenuti dalla valutazione delle stime di variabilità biologica di enolasi neurone specifica e S100- $\beta$  utilizzando la lista di controllo BIVAC ottenute dagli studi studi EuBIVAS (10) e Johnson et al. (11)

	Quesito	EuBIVAS	Johnson et al.	Motivazione del grado di qualità diverso da A
1	Scala	A	A	
2	Soggetti	A	B	Non è indicato il sesso dei partecipanti
3	Campioni	A	A	
4	Misurando	A	A	
5	Procedure pre-analitiche	A	A	
6	Stime di variabilità analitica	A	B	Le stime di variabilità analitica sono desunte dai controlli di qualità interno
7	Stato stazionario	A	C	Lo stato stazionario non è stato verificato
8	Outliers	A	C	Analisi degli outliers non effettuata
9	Normalità di distribuzione dei dati	A	B	La normalità delle distribuzioni non è stata verificata
10	Omogeneità della varianza	A	A	
11	Metodi statistici	A	B	Sottrazione di varianze (la componente di variabilità analitica non è stata calcolata sui replicati dei campioni in studio)
12	Limiti di confidenza	A	C	I limiti di confidenza sono desunti erroneamente da precedente pubblicazione
13	Numero dei risultati inclusi	A	C	L'analisi degli outliers non è stata effettuata
14	Valori medi di concentrazione	A	A	
	Punteggio totale	A	C <sub>7,8,12,13</sub>	

molto più ampi degli IC calcolati nello studio EuBIVAS e questo comporta che, per il calcolo delle nuove stime di VB con la meta-analisi (che oltre all'ampiezza degli IC tiene conto del punteggio ottenuto da BIVAC (9), il peso dei lavori EuBIVAS/Johnson et al. (11), risulta essere 81:1 per NSE e 76:1 per S100- $\beta$ . Da sottolineare per

altro che gli IC di confidenza indicati da Johnson et al. non sono correttamente calcolati ma, come dichiarato dagli stessi autori, sono desunti dai valori della tabella precedentemente pubblicata da Røraas et al. (26) per lo stesso numero di soggetti, e analogo rapporto tra la variabilità analitica ed intra-individuale. I dati indicati

dalla pubblicazione di Røraas però, sono calcolati per analisi effettuate in duplicato, e quindi sono stati erroneamente utilizzati da Johnson et al. che al contrario hanno misurato i campioni in singolo. Questa è la ragione per cui nella Tabella 4 al lavoro di Johnson viene attribuito il punteggio C al QI12 (Tabella 3).

L'ampiezza degli IC intorno alle stime di VB, dipende dal disegno sperimentale dello studio, in modo particolare dal numero dei soggetti, dal numero dei campioni per soggetto e dal numero dei replicati, oltre che dal  $CV_A$  (26). Quindi, dalla differenza dei due disegni sperimentali ne consegue che l'ampiezza degli IC dello studio di Johnson intorno ai dati di  $CV_I$  è di 20 volte superiore all'ampiezza degli IC intorno alle stime EuBIVAS per entrambe le proteine (Tabella 3).

Il sesso dei partecipanti allo studio di Johnson et al. non è stato dichiarato, ed è stata fornita solo l'età media dei dieci soggetti (25 anni). L'ampia numerosità dei soggetti arruolati in EuBIVAS ha permesso di verificare che non c'è differenza significativa tra i sessi, così come non c'è differenza nei gruppi di età considerati. In un disegno sperimentale di VB sarebbe auspicabile avere una numerosità sufficiente per verificare l'eventuale differenza tra sessi, e dipendenza dall'età, che sono state dimostrate essere variabili importanti per diversi misurandi (25,27).

In questo confronto però, non essendo il sesso un fattore importante per i misurandi in questione, al QI 2 (descrizione della popolazione) dello studio di Johnson è stato assegnato il punteggio B (Tabella 4) e non il punteggio C che sarebbe stato assegnato nel caso in cui ci fosse stata una presunta dipendenza delle stime di VB dalle variabili sesso ed età.

Un altro punto critico delle stime di VB pubblicate dallo studio di Johnson è relativo alle stime della variabilità analitica che non sono state ottenute da misure in duplicato dei campioni umani, misurati in singolo, ma dai materiali del controllo di qualità interno. Il QI 6 dello studio di Johnson et al. è quindi stato valutato B. È importante che il  $CV_A$  sia correttamente calcolato, come per altro raccomandato dai documenti EFLM di recente pubblicazione (9,18). Il dato del  $CV_A$  è infatti un dato normalizzato per la concentrazione del campione, e non è detto che i materiali di controllo abbiano la stessa concentrazione riscontrata nella popolazione in esame. In secondo luogo, la matrice del campione di controllo non è uguale alla matrice dei campioni umani, e questa differenza potrebbe avere conseguenze sulla stima della variabilità analitica.

Lo studio di Johnson et al. non dichiara di avere verificato lo stato stazionario dei soggetti, pur avendo raccolto campioni dopo 48 o 72 ore dall'allenamento sportivo. In realtà esistono per la S100- $\beta$  evidenze in letteratura che lo stato stazionario si raggiunge nell'arco delle 48 ore dopo l'attività sportiva (10), ma evidenze analoghe per la NSE ad oggi non se ne hanno. In accordo con BIVAC, se lo stato stazionario non è garantito, il punteggio del QI 7 è C.

Infine, Johnson et al. non dichiarano di aver effettuato alcuna analisi degli outliers (QI 8), indicatore di

qualità risultato essere quello con maggiore criticità, utilizzando BIVAC, nel primo gruppo di 117 articoli valutati dal gruppo di lavoro di EFLM (9).

## CONCLUSIONI

È molto probabile che i disegni sperimentali delle pubblicazioni di VB che non soddisfano gli indicatori di qualità evidenziati dalla lista di controllo BIVAC risultino meno affidabili e probabilmente riportano stime di VB più alte di quelle reali, e con IC troppo ampi. Nel disegnare uno studio di VB, è importante che vengano considerati e inclusi tutti gli elementi indicati in BIVAC che possano avere un'influenza sulla affidabilità dei risultati. Gli studi inoltre devono avere un potere statistico adeguato, e questo dipende dalla numerosità dei soggetti, dei campioni per soggetto, e dal numero dei replicati, in funzione del rapporto tra  $CV_A$  and  $CV_I$  come indicato da Røraas et al. (26).

EuBIVAS, che è stato disegnato pienamente rispondente ai criteri di qualità indicati da BIVAC, nascendo come progetto multicentrico, ha coinvolto un alto numero di soggetti e di campioni per soggetto, e pertanto risulta avere un elevato potere statistico permettendo la verifica della possibile influenza di variabili quali età e sesso sulle stime di VB. Le stime di VB ottenute da EuBIVAS pubblicate fino ad ora (10, 13-16), e di conseguenza le DC e le APS da loro derivate, sono più basse di quelle ottenute da studi non pienamente rispondenti a BIVAC (25,28) e questo viene confermato anche per NSE e S100- $\beta$  (Tabella 3).

Inoltre i valori di VB ottenuti da EuBIVAS presentano degli IC decisamente più stretti rispetto ai dati di Johnson et al, indicandone la maggior affidabilità nel loro utilizzo per il calcolo delle APS e delle DC usate per la diagnosi e per il monitoraggio dei pazienti.

## RINGRAZIAMENTI

L'avvio del progetto EuBIVAS è stato realizzato grazie al supporto di SIBioC e grazie alla ditta Roche che ha donato tutti i materiali utilizzati per le analisi, e che ci ha permesso di utilizzare uno strumento (Cobas 6000 e801) dedicato al progetto. Gli Autori sono inoltre grati a tutti i volontari che sono stati arruolati nel progetto.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Questo documento è stato realizzato con il contributo non condizionante di Roche.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fraser CG. The nature of biological variation. In: Biological variation: from principles to practice. Washington: AACC Press, 2001;1-27.
2. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Desirable specification for total error, imprecision, and bias, derived from intra and inter-individual biologic variation. The 2014 update. Available from: [www.westgard.com/biodatabase1.htm](http://www.westgard.com/biodatabase1.htm). (ultimo accesso: maggio 2018).

3. Perich C, Minchinella J, Ricos C, et al. Biological variation database: structure and criteria used for generation and update. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:299–305.
4. Carobene A. Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:871–7.
5. Carobene A, Braga F, Røraas T, et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and g-glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1997–2007.
6. Braga F, Dolci A, Mosca A, et al. Biological variability of glycated hemoglobin. *Clin Chim Acta* 2010;411:1606–10.
7. Braga F, Panteghini M. Biological variability of C-reactive protein: is the available information reliable? *Clin Chim Acta* 2012;413:1179–83.
8. Sandberg S, Fraser FG, Horvath AR, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:833–5.
9. Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, et al. The biological variation data critical appraisal checklist (BIVAC): a standard for evaluating studies on biological variation. *Clin Chem* 2018;64:501-14.
10. Carobene A, Guerra E, Locatelli M et al. providing correct estimates of biological variation-not an easy task. The example of S100- $\beta$  Protein and Neuron-Specific Enolase. *Clin Chem* 2018;64:1537-38.
11. Johnson PR, Gwilt SC, Neville CG. Estimates of within person biological variation and reference change values of serum S100B and NSE proteins. *Clin Chem* 2018;64:866-8.
12. Carobene A, Strollo M, Jonker N, et al. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the working group on biological variation established by the European federation of clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1599-608.
13. Carobene A, Røraas T, Sølviik UØ, et al. Biological variation estimates obtained from 91 healthy study participants for 9 enzymes in serum. *Clin Chem* 2017;63:1141-50.
14. Carobene A, Marino I, Coskun A, et al. The EuBIVAS project: Within- and between-subject biological variation data for serum creatinine using enzymatic and alkaline picrate methods and implications for monitoring. *Clin Chem* 2017;63:1527–36.
15. Aarsand AK, Díaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, et al. The EuBIVAS: within- and between-subject biological variation data for electrolytes, lipids, urea, uric acid, total protein, total bilirubin, direct bilirubin, and glucose. *Clin Chem* 2018;64:1380-93.
16. Carobene A, Guerra E, Locatelli M, et al. Biological variation estimates for prostate specific antigen from the European Biological Variation Study; consequences for diagnosis and monitoring of prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2018;486:185-91.
17. Røraas T, Stove B, Petersen PH, et al. Biological variation: the effect of different distributions on estimated within-person variation and reference change values. *Clin Chem* 2016;62:725–36.
18. Bartlett WA, Braga F, Carobene A, et al. A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:879-85.
19. Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: an update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53:313-25.
20. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. 8th Ed. Ames (IA): Iowa State University Press; 1989.
21. Cochran WG. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann Eugen* 1941;11:47–52.
22. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 1965;52:591.
23. Sahai H, Ojeda MM. *Analysis of variance for random models*. Vol. 1. Basel (Switzerland): Birkhäuser Basal; 2004.
24. Dixon WJ. Processing data for outliers, *Biometrics* 9 (1953) 74–89.
25. Carobene A. La variabilità biologica: le basi teoriche e l'esperienza dei Gruppi di Lavoro della Federazione Europea di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2018;42:15-25.
26. Røraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem* 2012;58:1306-13.
27. Carobene A, Graziani MS, Lo Cascio C, et al. Age dependence of within-subject biological variation of nine common clinical chemistry analytes. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:841-4.
28. Carobene A on behalf of the EFLM Working Group on Biological Variation. The European Biological Variation Study (EuBIVAS): delivery of updated biological variation estimates, a project by the Working Group on Biological Variation in the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *J Lab Precis Med* 2017;2:70.

## La catena di custodia: problematiche generali ed esperienza nella Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 Centro

Giuliana Canonico, Daniela Giardiello, Agnese Morani, Patrizia Frassi, Gabriella Friggeri, Maria Giulia Galati, Luigi Vrenna, Maurizio D'Amora

Unità Operativa Complessa. Laboratorio di Patologia Clinica e Polo Tossicologico di Riferimento Territoriale per le Farmacodipendenze e le Patologie Correlate, Presidio Sanitario Polifunzionale Loreto Crispi Asl Napoli 1 Centro

### ABSTRACT

**The chain of custody: general issues and the experience of the Azienda Sanitaria Locale of Naples (Italy).** The toxicology laboratories were created at the end of 1996 within the city area of Naples (Italy) and, so far, have gained an important experience. Their tasks are to monitor drug abuse, the use of metadone and buprenorphine and the diagnosis and monitoring of alcoholism through the screening of urine and serum samples. From this long-lasting experience, we realized that one of the main critical concern of this activity is the implementation and the maintenance of the custody chain, that is especially needed in the presence of forensic issues. The aim of this paper is to analyze the Italian national and regional laws and administrative indications on this topic. We dedicated a particular interest to the rules established by the Regione Campania, where the laboratory is situated. After considering that a high percentage of samples non-conformities were due to the lack of a proper chain of custody (i.e. 66.7%), we adopted a specific procedure based on the use of a dedicated kit containing both the tubes for a safe sample collection and the related documents. A large amount of time was dedicated to illustrate and diffuse the procedure to the nurses and the other personnel working mainly in the First Aid centers of the Azienda Sanitaria Locale of Naples. The collected data show that the percentage of the unsuitable samples decreased to 38% at the end of the year 2017 when the information and training courses succeeded in involving all the dedicated personnel. We plan to revise periodically the procedures and reinforce the message to further optimize the results.

### INTRODUZIONE

Il dettato di diversi articoli del codice di procedura penale (articoli 191, 244, 247, 352, 354) consente una prima, anche se parziale, definizione della catena di custodia: essa attiene a tutte le operazioni, da chiunque e comunque compiute durante le attività inerenti le estrapolazioni di dati e la loro conservazione, ed è finalizzata a verificare che dette attività non siano intervenute sul dato originale modificandolo o, nella fase di sua conservazione alterandolo o, non rendendo più possibile l'analisi in epoca successiva alla raccolta. Sotto il profilo strettamente giuridico l'inquadramento dell'argomento trova la sua ragione d'essere nelle cognizioni tecnico-scientifiche sufficienti e necessarie ad identificare quegli elementi che diverranno prove. Il legislatore ha ravvisato l'esigenza di non procedere con indicazioni di carattere tassativo e tassonomico, ma anzi, di riferirsi a criteri di tipo generale rimandando ogni

successiva determinazione circa la correttezza e la rispondenza alle migliori tecniche rispetto a quelle utilizzate, in considerazione della rapida evoluzione scientifica e tecnologica. E' importante considerare anche la definizione giuridica di prova scientifica. La più accreditata è quella proposta dal professor Oreste Dominioni (già Presidente dell'Unione Camere Italiane) che così l'ha definita: "può dirsi si tratti di operazioni probatorie per le quali, si usano strumenti di conoscenza attinti alla scienza ed alla tecnica, il cui uso richiede competenze esperte" (1). Come meglio inquadrato dall'avvocato Claudio Bossi " ...la prova scientifica, per essere prova, deve rispondere ...a regole scientifiche, metodologie tecniche, riconosciute quali affidabili, e utilizzare apparati tecnici affidabili e manovrati da soggetti dotati di competenze esperte" (2). Quindi occorrono: caratteri scientifici per l'ammissione della prova, per determinarne la sua assunzione, e per la sua valutazione.

Corrispondenza a: Maurizio D'Amora, Laboratorio Patologia Clinica e Polo Tossicologico di Riferimento Territoriale per le Farmacodipendenze e le Patologie Correlate, Via M. Schipa, 135 80122 Napoli, Tel 081/2547234, e-mail lab.crispi@aslnapoli1centro.it

Ricevuto: 09.01.2018

Revisionato: 08.06.2018

Accettato: 12.06.2018

Pubblicato on-line: 15.11.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.67

Nelle indagini tossicologiche con valenza forense, è indispensabile la certezza della identità del campione biologico e della sua rintracciabilità in tutte le fasi operative, dall'acquisizione fino allo smaltimento (3, 4). A tale scopo è necessario istituire la procedura denominata catena di custodia che documenti, con apposita modulistica, tutte le fasi preanalitiche, la manipolazione, lo stoccaggio del campione, nonché l'analisi e la refertazione.

La catena di custodia rappresenta, pertanto, la documentazione che garantisce l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità, in termini di trasporto del campione, dal momento del prelievo al momento dell'analisi. La modulistica relativa deve riportare: le generalità del soggetto sottoposto ad indagine, un numero identificativo univoco, la data del prelievo, la tipologia di materiale biologico, l'ente richiedente, le finalità dell'indagine, eventuali terapie in corso, le generalità, ora e firma del prelevatore o di chi ha assistito alla raccolta del campione, generalità, ora e firma del/i addetto/i al trasporto, generalità, ora e firma del personale del laboratorio che riceve in carico il campione, luogo di conservazione del campione. Un documento di trasporto è necessario per i campioni provenienti da strutture esterne a quella in cui è situato il laboratorio di esecuzione dell'analisi. Le provette delle diverse matrici biologiche, devono essere allocate in contenitori di sicurezza dedicati, uno per la matrice ematica ed un altro per la matrice urinaria, come disposto dall'articolo 4 della circolare 3/2003 del Ministero della Salute (5).

In quest'ottica, l'organizzazione del laboratorio deve essere tale da garantire la corretta procedura, a partire da una regolamentazione dell'accesso al laboratorio che deve essere limitato al solo personale autorizzato (6).

Il prelievo del campione deve essere preceduto da una fase di accettazione comprendente l'identificazione del soggetto, che deve firmare un consenso informato contenente in maniera chiara ed esaustiva la finalità dell'indagine e la tipologia delle analisi da eseguire. Al campione biologico, prelevato nel rispetto della privacy e con la garanzia dell'identità, deve essere assegnato un numero identificativo univoco cui fare riferimento in tutte le fasi successive.

Il laboratorio, una volta ricevuto il materiale biologico da esaminare, in via preliminare deve assicurare che una provetta sia conservata per un tempo non inferiore ad un anno per poter essere disponibile in caso di eventuali contestazioni. La quantità di campione prelevato deve essere sufficiente sia per l'espletamento delle analisi in funzione della finalità dell'indagine, che per una eventuale ripetizione dell'analisi stessa. Le modalità di conservazione del campione devono essere idonee affinché lo stesso mantenga le caratteristiche organolettiche garantendo in tal modo l'inalterabilità delle sostanze eventualmente presenti nel campione.

In Italia, la carenza di precise normative nazionali, riguardanti la determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso, ha comportato l'adozione da parte d'ogni singolo laboratorio analisi, di modalità operative proprie basate prevalentemente su criteri locali

(esigenze della domanda, disponibilità di mezzi) ed individuali (esperienza specifica nel settore). Ciò oltre a generare negli operatori del settore una sorta di isolamento, se non addirittura di insicurezza sulla congruità delle procedure utilizzate, ha determinato inevitabilmente una carenza di omogeneità metodologica tra i vari laboratori, riscontrabile in tutte le varie fasi del ciclo analitico. Stante l'assenza dell'intervento del legislatore e visti gli indirizzi operativi delle società scientifiche e dell'Istituto Superiore di Sanità, per perseguire appropriatezza occorre applicare le linee guida disponibili (7-15). E' necessario inoltre, l'adozione di un sistema di qualità che fornisca garanzie alla gestione del sistema (16).

Va notato che la modifica del titolo V della Costituzione con la regionalizzazione del Sistema Sanitario Nazionale ha determinato un variopinto quadro disomogeneo ove in alcune regioni spicca, ancora oggi, l'assenza di regolamentazione nello specifico settore.

L'obiettivo di raggiungere modalità operative efficaci ed univoche, procedure omogenee, riproducibilità del dato analitico e della sua formulazione nelle analisi tossicologiche, ha comportato la necessità di uniformare le procedure, al fine di garantire comportamenti omogenei tra i laboratori di analisi, almeno all'interno della stessa azienda sanitaria, al fine di assicurare benefiche ripercussioni per gli operatori del settore e per gli utilizzatori del servizio. L'auspicio è quello di condividere l'esperienza maturata con gli operatori delle altre aziende sanitarie regionali e proporre alle strutture competenti della regione un modello operativo univoco.

## ASPETTI NORMATIVI

### Aspetti normativi nazionali

I primi riferimenti normativi inerenti gli accertamenti diagnostici per la tossicodipendenza si possono riferire alla Legge 162 del 26/06/1990 confluita nel Decreto Presidente della Repubblica (DPR) 30 del 09.10.1990 (Gazzetta Ufficiale n. 250 del 31.10.1990) ed al Decreto Ministeriale (DM) 444 del 30.11.1990 pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale 25 del 30.01.1991 e successive modifiche ed integrazioni. Il 25.02.2005 è stato redatto il Protocollo Operativo alcol/droga per gli accertamenti richiesti ai sensi del comma 5 dell'articolo 186 e 187 del Decreto Legislativo (DL) 285 del 30.04.1992 e successive modificazioni sui conducenti coinvolti in incidenti stradali e sottoposti a cure mediche presso strutture sanitarie. I principali riferimenti normativi nazionali sono riportati nella Tabella 1 (17-18). L'applicazione di un'affidabile catena di custodia, così come prevista dall'Intesa Stato/Regioni (Provvedimento 99 Conferenza Unificata del 30.10.2007; Gazzetta Ufficiale 266 del 15.11.2007) e dell'Accordo Stato/Regioni del 18.09.2008 (Gazzetta Ufficiale 236 del 08.10.2008) in materia di "Accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la

**Tabella 1**

Riferimenti legislativi nazionali

Ambiti di diagnosi	Riferimenti legislativi
Regolamento concernente la determinazione dell'organico e delle caratteristiche organizzative e funzionali dei servizi per le tossicodipendenze da istituire presso le unità sanitarie locali	Decreto Ministeriale 444/90
Identificazione delle cause di intossicazione acuta e cronica	—
Idoneità psico-fisica alla guida, finalizzata alla revisione o conseguimento della patente di guida	Articoli 119, 128, 320 del Nuovo Codice della Strada
Disabilità alla guida, con rilievo di stato di ebbrezza o dell'influenza di sostanze stupefacenti e/o psicotrope	Articoli 186 e 187 del Nuovo Codice della Strada
Idoneità lavorativa per mansioni a rischio, subordinata al rilievo dell'assenza di quadri d'abuso e/o dipendenza da sostanze psicotrope	Decreto Presidente della Repubblica 309/90; Decreto legislativo 285/92; Legge 125/2001; Decreto legislativo 81/2008; Legge 94/2009
Idoneità porto d'armi	Articoli 1, 2 e 3 del Decreto Ministeriale Sanità 28/04/1998
Diagnosi di tossicodipendenza nei detenuti, con conseguenti benefici in ambito detentivo esitanti, talvolta, anche nella sospensione della pena	Articolo 96 del Decreto Presidente della Repubblica 309/90. Testo Unico Stupefacenti
Valutazione astinenza in soggetti sottoposti a programmi terapeutici di mantenimento o disassuefazione	Articoli 75, 120 e 122 del Decreto Presidente della Repubblica 309/90. Testo Unico Stupefacenti
Adesione al trattamento di soggetti in regime di sospensione del procedimento o di esecuzione della pena o di sostituzione della pena stessa	Articoli 90 e 94 del Decreto Presidente della Repubblica 309/90. Testo Unico Stupefacenti
Diagnosi di tossicodipendenza della madre durante la gravidanza con conseguenze per la tutela del minore (fino alla dichiarazione di adottabilità)	—
Idoneità all'affidamento dei figli nei casi di separazione coniugale	—
Assenza di sostanze proibite in materia di antidoping	Legge 376/2000
Idoneità a particolari norme concorsuali	—

Parzialmente modificata da *Biochim Clin* 2017;41:258-65.

sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi" (19-20) è l'obiettivo di tutti gli operatori del settore. Modalità operative, che adattino le procedure ai diversi contesti di applicazione nei casi reali, senza pregiudicare gli aspetti essenziali di salvaguardia dei principi di rispetto, identità, correttezza e riferibilità dei campioni, sono senz'altro accettabili specie in considerazione che a tutt'oggi non esiste la codifica normativa di un modello univoco nazionale anche in tema di matrici (21-27). Il Gruppo Tossicologi Forensi Italiano (GTFI) ha emanato diverse linee guida inerenti la tossicologia forense e, secondo la revisione 3 del 1 marzo 2010 (12), la catena di custodia è definita la "Procedura documentata clinica e/o medico-legale atta a garantire l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità di un campione dal momento del prelievo/raccolta sino allo smaltimento; essa deve permettere, tra l'altro, di ricostruire l'iter del campione all'interno del laboratorio, di conoscere in ogni momento l'ubicazione, di identificarlo in maniera inequivocabile, di conservarlo correttamente e di verificare la correttezza delle condizioni di conservazione, di preservarlo in tutte le fasi da manomissioni e adulterazioni volontarie ed involontarie, nonché di individuare tutte le movimentazioni e manipolazioni del campione, in quali

date e da quali soggetti esse sono state eseguite." La tematica è riportata anche da altri autori (28-29). Il Decreto Legislativo 81 del 9.04.2008, infine, norma il tema della sicurezza sul lavoro; contestualmente, la conferenza stato-regioni nella seduta del 18.09.2008 ha stabilito le procedure per gli accertamenti di tossicodipendenza per determinate categorie di lavoratori prima dell'assunzione e periodicamente durante il servizio.

### Aspetti normativi regionali

Non tutte le 20 regioni italiane attualmente hanno provveduto, come già accennato, a normare in tema di catena di custodia. Sono rappresentate nella Tabella 2 le singole regioni adempienti con l'indicazione dei provvedimenti adottati da ciascuna di esse. La maggior parte degli interventi normativi datati da circa un decennio, non hanno ricevuto aggiornamenti, ad eccezione del Lazio intervenuto nell'anno 2016.

Si cita quale valido esempio, tra tutti, l'assessorato alla sanità della regione Piemonte che nell'anno 2000 attraverso il gruppo di lavoro "Progetto tossicologia" ha emanato specifico provvedimento con l'obiettivo di

**Tabella 2**  
*Il quadro normativo di riferimento nelle regioni italiane*

Regione	Anno	Provvedimenti
Emilia Romagna	2005	Delibera di Giunta Regionale 1789. Linee guida sui requisiti organizzativi e di funzionamento dei laboratori antidoping regionali.
Toscana	2008	Delibera di Giunta Regionale 868. Linee di indirizzo regionali per le procedure relative agli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi.
Campania	2009	Delibera di Giunta Regionale 1448 Protocollo operativo per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai sensi dell'Intesa Stato/Regioni
Liguria	2009	Delibera di Giunta Regionale 566. Indicazioni operative per le procedure relative agli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi
Lombardia	2009	Delibera di Giunta Regionale VIII/9097. Determinazioni in merito alla ricerca di sostanze stupefacenti e psicotrope nei materiali biologici e al dosaggio dell'etanolo.
Piemonte	2009	Delibera di Giunta Regionale 13-10928. Linee di indirizzo regionali per le procedure relative agli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi
Sardegna	2009	Delibera di Giunta Regionale 10/42. Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai sensi dell'Intesa Stato/Regioni del 30.10.2007 e 18.09.2008.
Sicilia	2009	Decreto assessore (pubblicato sulla GU della regione Siciliana n. 40 del 28.08.2009) ha normato le Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai sensi dell'intesa Stato-Regioni del 30.10.2007 e dell'accordo Stato-Regioni del 18.09.2008.
Veneto	2009	Delibera di Giunta Regionale 660. Caratterizzazione chimico-fisica di sostanze stupefacenti d'abuso diffuse sul territorio.
Puglia	2010	Atti di indirizzo per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5.06.2003, n. 131, in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, del Provvedimento n. 99 approvato dalla Conferenza Unificata Stato-Regioni il 30.10.2007 e dell'Accordo Stato/Regioni del 18.09.2008.
Lazio	2016	Decreto del Commissario ad Acta U00288. Protocollo operativo sui prelievi e accertamenti necessari nei casi di omicidio e lesioni personali stradali gravi e gravissime – Artt. 589-bis e 590-bis Legge n. 41/2016.

raggiungere modalità operative efficaci ed univoche, procedure omogenee, riproducibilità del dato analitico e della sua formulazione nelle analisi tossicologiche; ciò ha comportato la necessità di uniformare le procedure, al fine di garantire comportamenti omogenei tra i laboratori analisi della regione, con benefiche ripercussioni per gli operatori del settore e per gli utilizzatori del servizio.

### Il quadro normativo della regione Campania

Con la Delibera Giunta Regionale 218 del 01.02.2008 la regione Campania ha recepito l'intesa, ai

sensi dell'articolo 8, comma 6, della Legge 131 del 5.06.2003, in materia di accertamenti di assenza di tossicodipendenza rimandando a successivi atti amministrativi, l'emanazione di un *vademecum* tale da garantire uniformità nelle procedure diagnostiche seguite e nelle modalità attuative, nell'impellente necessità di individuare percorsi comuni. Con la Delibera 1448/2009 è stato recepito il "Protocollo operativo per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai

sensi dell'Intesa Stato/Regioni (Provvedimento n. 99/CU del 30.10.2007) e dell'Accordo Stato/Regioni (repertorio atti n 178 del 18.09.2008), elaborato da specifico gruppo di lavoro regionale. La regione Campania inoltre, con la delibera n 133 del 12.04.2011 pubblicata sul Bollettino Ufficiale Regione Campania del 18.04.2011, ha previsto i requisiti minimi delle strutture sanitarie deputate all'espletamento di prestazioni diagnostiche inerenti la tossicologia di I livello in ambito della medicina del lavoro e della tossicologia forense e con la Delibera 429 del 22.10.2013 ha provveduto ad aggiornare l'elenco delle strutture.

### **L'ESPERIENZA DELL'AZIENDA SANITARIA LOCALE NAPOLI 1 CENTRO**

La sezione di tossicologia è attiva, quale settore specialistico della Unità Operativa Complessa Laboratorio di Patologia Clinica, dal 1.05.1999 ed ha maturato una notevole esperienza in ambito della diagnostica chimico-tossicologica e nella tossicologia medico-legale (30). L'Azienda Sanitaria Locale (ASL) denominata Napoli 1 Centro è tra le maggiori aziende sanitarie italiane: annovera 11 distretti sanitari e 10 ospedali, di cui 5 dotati di Pronto Soccorso, e 1 Presidio Sanitario Intermedio e serve 970.185 abitanti (dati Istat al 31.12.2016). Oltre all'attività effettuata per i 10 Servizi per le Tossicodipendenze (SerT) aziendali e le 3 strutture carcerarie metropolitane (Casa Circondariale di Napoli-Poggioreale, Centro Penitenziario di Napoli-Secondigliano con Ospedale psichiatrico giudiziale, Carcere minorile di Nisida) la struttura si interessa anche della abilitazione degli utenti sanzionati per violazione del nuovo codice della strada, sottoposti a verifica, per conferma, o idoneità per l'acquisizione della patente di guida da parte della commissione medica locale. L'attività del centro è rivolta anche ai lavoratori sottoposti a vigilanza del medico competente per le tutele previste dalla legge per i lavoratori con mansioni a rischio di diverse aziende operanti a livello regionale, pubbliche e private di rilevanza nazionale, le verifiche di idoneità per il rilascio del porto d'armi, le indagini previste per le adozioni richieste dal tribunale dei minorenni di Napoli, le idoneità alle procedure concorsuali (ad esempio per l'arruolamento nelle forze armate dello stato e/o nelle forze dell'ordine). Come risultato di questa attività, negli ultimi dieci anni sono stati esaminati circa 11.000 campioni ematici e 3.800 campioni urinari. Negli ultimi due anni (2016-2017) sono pervenuti complessivamente 410 campioni dai punti di pronto soccorso dell'ASL Napoli 1 Centro da sottoporre ad indagini tossicologiche. L'esperienza maturata ci ha permesso di individuare alcune criticità del ciclo lavorativo determinate anche da una carenza di protocolli operativi condivisi e/o adottati uniformemente a livello locale e/o regionale (31).

### **Le problematiche e gli interventi effettuati**

Tra le criticità riscontrate, un dato saliente è rappresentato dalle non conformità della catena di

custodia. Nell'anno 2016, infatti, sono pervenuti al laboratorio 256 campioni dai punti di pronto soccorso cittadini di cui ben 171 (66,7%) con la catena di custodia non correttamente osservata (Tabella 3). Ricordiamo che la catena di custodia tossicologica è l'insieme degli interventi clinici e di laboratorio, interamente registrati su supporti cartacei ed informatici e conservati per minimo di 5 anni, attraverso i quali viene garantita, ai fini medico-legali, la tracciabilità delle diverse fasi riguardanti indagini tossicologiche che vanno dal momento del prelievo di materiali biologici fino alla conservazione adeguata dei campioni che deve essere garantita per i successivi 12 mesi. Per ridurre quanto più possibile le non conformità, in applicazione di quanto stabilito in materia in sede di conferenza stato-regioni considerando l'assenza in regione Campania di normativa specifica, e al fine di uniformare nella nostra azienda sanitaria, le procedure della catena di custodia, si è richiesta la fornitura di un kit specifico per accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza (kit anti-manomissione) che è stata aggiudicata a novembre del 2016.

Il kit aggiudicato è costituito da un contenitore per la raccolta dell'urina con sonda di campionamento sottovuoto chiuso in un sacchetto sigillato, un sacchetto di sicurezza trasparente con chiusura anti effrazione e codice a barre univoco, una etichetta di sicurezza per la chiusura del kit al termine della procedura, un verbale di raccolta (Figura 1) in triplice copia: per il medico richiedente, per il laboratorio e per il cittadino/paziente sottoposto all'accertamento al quale va anche consegnata la nota informativa inclusa. Nel kit sono presenti 6 provette sottovuoto per la raccolta di aliquote di urina, identificate con etichette anti-effrazione riportanti un codice a barre univoco corrispondente al codice presente sulla busta di sicurezza trasparente utilizzata per il trasporto dei campioni, sei tappi di sicurezza per sigillare le provette post raccolta, accompagnate da sei sigilli di sicurezza da applicare sul tappo delle provette. La rimozione dei sigilli autoadesivi comporta la comparsa della scritta indelebile "VOID" evidenziando un'eventuale manomissione. Per facilitare l'acquisizione delle procedure, si è provveduto ad illustrare tutti i passaggi in una presentazione elaborata con software "Power Point" che è stata consegnata ed illustrata nel corso di incontri formativi/informativi specifici a tutti gli operatori medici e sanitari operanti nei diversi punti di possibile richiesta di indagini tossicologiche. Tale attività è stata completata nel mese di agosto 2017, mentre i primi campioni biologici raccolti secondo la nuova procedura, sono pervenuti al laboratorio già dal mese di aprile 2017. La procedura su supporto informatico è inoltre a disposizione dei coordinatori delle strutture interessate per consentire la formazione continua del personale in quanto le unità infermieristiche possono variare nell'articolazione dell'attività sulle 24 ore e provenire da Unità Operative diverse da quelle inizialmente coinvolte.

Nella Figura 2 e nelle Tabelle 3, 4 e 5 sono forniti i dati del biennio 2016-2017 con le relative criticità. Sono

Scheda A

**MODULO DI CAMPIONAMENTO-RICHIESTA PER DOSAGGIO ALCOOLEMIA E RICERCA DI DROGHE D'ABUSO**

**Il presente verbale deve essere emesso in n° 3 copie**

Ospedale.....	Reparto.....	Numero cartella.....	clinica.....
Data Accettazione.....Ora.....			

Nome.....Cognome.....Data di nascita.....  
 Luogo di nascita.....Nazionalità.....Doc.....N.....Rilasciato da.....il.....Residenza.....Tel.....

Rientra in uno dei seguenti casi: conducente di età inferiore a ventuno anni; neo-patentato; esercita professionalmente l'attività di trasporto di persone o di cose SI  NO

**CONSENSO INFORMATO PER IL PRELIEVO \*(vedi informativa all. 1)**

La persona sopraindicata è stata informata preventivamente ed esaurientemente delle modalità del prelievo/raccolta e delle finalità dello stesso. Ha dichiarato di consentire al prelievo di sangue ed alla raccolta delle urine per le indagini di laboratorio previste.

NO  SI firma interessato .....  
 Non è stato possibile acquisire valido consenso perché la persona non era in grado di esprimerlo.

**SPAZIO RISERVATO AL SANITARIO RICHIEDENTE**

DROGHE D'ABUSO  ALCOOL  
 Kit catena di custodia  Kit catena di custodia

Nota.....  
 Evento verificatosi alle ore.....(come da verbale Forze dell'ordine e/o 118)

**CAMPIONAMENTO DOSAGGIO ALCOOLEMIA**

Data e Ora del Prelievo .....

Suddiviso ed etichettato da:	Provetta A.....ml	CODICE A BARRE
	Provetta B.....ml	PROVETTE
	Provetta C.....ml	

Prelevato in provetta con sodio fluoruro detergendo la cute con prodotti non alcoolici

*I contenitori devono essere a perfetta tenuta e conservati a +2/+8 °C. Laddove i campioni siano analizzati oltre le 24 h dal prelievo la conservazione dovrà avvenire a -18/-22 °C*

**CAMPIONAMENTO PER LE SOSTANZE D'ABUSO**

Data e Ora della raccolta .....

Suddiviso ed etichettato da:	Provetta A.....ml	CODICE A BARRE
	Provetta B.....ml	PROVETTE
	Provetta C.....ml	

*I campioni vengono consegnati a.....e conservati presso.....*  
 Firma.....

Data e Ora: Napoli,..... Firma del supervisore al campionamento

**MODULO DI TRASPORTO DEI CAMPIONI BIOLOGICI** Scheda B

Provenienza: P.S. del P.O.....cartella clinica.....

I campioni prelevati vengono consegnati ai preposti al trasferimento degli stessi, in contenitore refrigerato, presso il laboratorio dell'ASL Napoli 1 Centro P.S.P. " S.M. Loreto Crispi" Polo Tossicologico di Riferimento Territoriale per le Farmacodipendenze e le Patologie Correlate.

<b>CATENA DI CUSTODIA</b>	
Ricevuti da.....	data e ora.....(PERSONALE DEL PRONTO SOCCORSO)
Firma.....	
Consegnati a:	
Nome e cognome.....	Matricola n°..... Firma.....(AUTISTA)
Nome e cognome.....	Matricola n°..... Firma.....(INFERMIERE)
Consegnati al laboratorio preposto alle indagini (DIRIGENTE DEL LABORATORIO)	
Nome e cognome.....	Matricola n°..... Firma.....

**DATA E ORA TRASPORTO.....**

**CONSEGNA IN LABORATORIO**

CAMPIONI CONSEGNATI: cartella clinica.....

Kit catena di custodia ALCOOLEMIA CODICE.....  
 Kit catena di custodia SOSTANZE D'ABUSO CODICE.....

**SI NO**

Acquisizione del consenso secondo le normative vigenti  
 Anagrafica paziente completa  
 Registrazione - data e ora dell'accettazione al P.S.  
 Registrazione - data e ora del prelievo  
 Idoneità Quali-quantitativa del campione rispetto alla richiesta d'analisi  
 Nome e firma del prelevatore su provette e verbali  
 Provette/Contentori correttamente sigillati con firma lungo il sigillo (tra tappo e provetta)  
 Etichetta anticatoggio sul contenitore raccolta provette  
 Corretta Modalità di conservazione del campione durante il trasporto  
 Nome e firma del trasportatore

DATA E ORA ACCETTAZIONE.....FIRMA DEL RICEVENTE.....

**CONSEGNARE AL MITTENTE**

CAMPIONI CONSEGNATI: cartella clinica.....

Kit catena di custodia ALCOOLEMIA CODICE.....  
 Kit catena di custodia SOSTANZE D'ABUSO CODICE.....

**SI NO**

Acquisizione del consenso secondo le normative vigenti  
 Anagrafica paziente completa  
 Registrazione - data e ora dell'accettazione al P.S.  
 Registrazione - data e ora del prelievo  
 Idoneità Quali-quantitativa del campione rispetto alla richiesta d'analisi  
 Nome e firma del prelevatore su provette e verbali  
 Provette/Contentori correttamente sigillati con firma lungo il sigillo (tra tappo e provetta)  
 Etichetta anticatoggio sul contenitore raccolta provette  
 Corretta Modalità di conservazione del campione durante il trasporto

Nome e firma del trasportatore

DATA E ORA ACCETTAZIONE.....FIRMA DEL RICEVENTE.....

**Figura 1**  
 Modulistica inclusa nel kit adottato.

altresi rappresentate le modificazioni intervenute dopo l'inserimento nel ciclo lavorativo ordinario del kit specifico per la catena di custodia (da aprile 2017) e dopo l'espletamento dei corsi di formazione/informazione effettuati nelle singole strutture richiedenti (da settembre 2017, Tabella 5). Come riportato nella Figura 2 e nelle Tabelle 3 e 4, nell'anno 2016 abbiamo registrato il 33,3% di campioni con catena di custodia rispettata, classificati idonei, contro il 66,7% di campioni con catena di custodia non rispettata, classificati non idonei; mentre nel 2017 gli idonei rappresentano il 44,8% ed i non idonei il 55,2%. La Tabella 4 illustra le variazioni numericamente più importanti riscontrate nelle non conformità; in particolare: la percentuale di richieste con numero di aliquote insufficienti è passata dal 10% al 5%, mentre l'errata etichettatura e sigillatura del sistema è diminuita dal 50% al 20%. È altresì evidente dalla Tabella 5 che le non conformità sono drasticamente diminuite dopo il completamento della formazione specifica del personale.

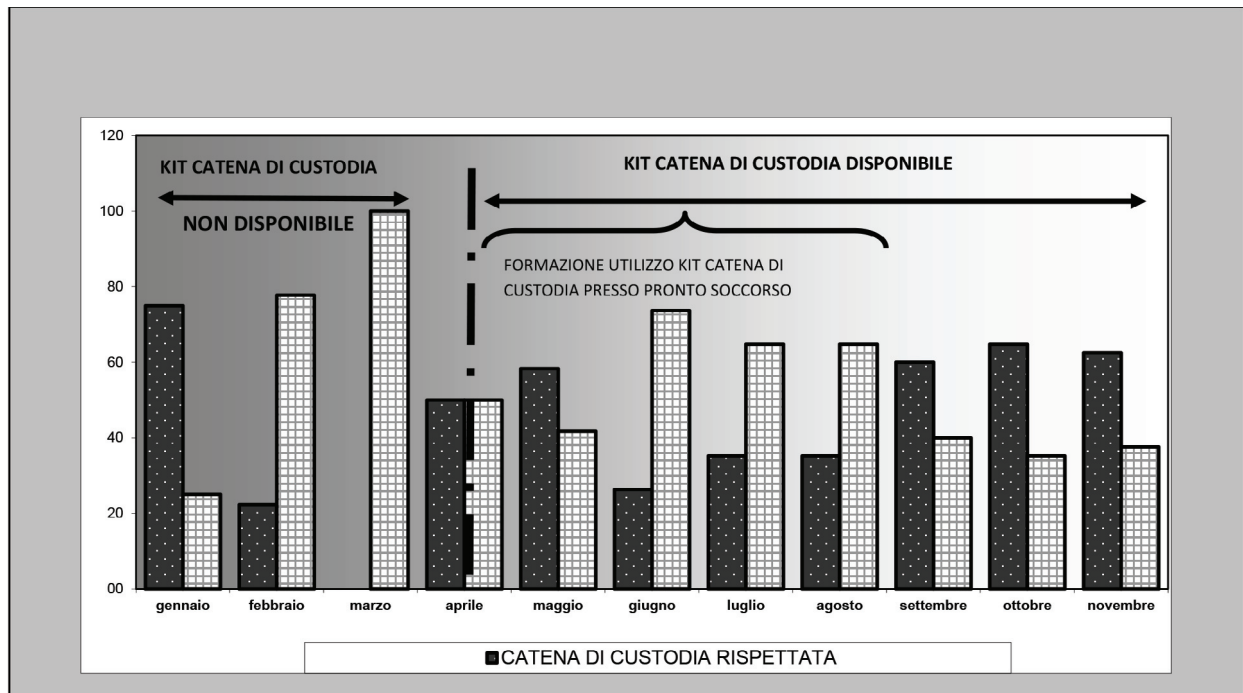
**CONCLUSIONI**

La numerosità delle non conformità riscontrata per l'attività di indagini tossicologiche nella nostra azienda sanitaria, unita alla riconosciuta importanza della implementazione di una corretta catena di custodia, ci ha indotto all'adozione di nuove procedure. Si è inteso sopperire alle criticità riscontrate, espletando una gara aziendale per la fornitura di un kit specifico innovativo e brevettato sia per la matrice ematica che per la matrice urinaria che garantisce sicurezza e tracciabilità (con l'ausilio di codici a barre univoci) nella raccolta e nel trasporto dei campioni biologici. E' stato adottato inoltre un nuovo protocollo operativo corredato da istruzioni di lavoro sia in formato cartaceo che su supporto informatico ed una nuova modulistica (Figura 1), al fine di uniformare le procedure nelle strutture servite dalla nostra azienda sanitaria. Un idoneo software commerciale consente la gestione ed il monitoraggio degli eventi.

La nostra esperienza, riferita al biennio 2016-2017, ha dimostrato che l'applicazione di un protocollo operativo omogeneo, sia sotto il profilo organizzativo che per la disponibilità di un kit unico e di una nuova modulistica comune a tutte le strutture aziendali, ha significativamente diminuito il tasso di non conformità che è passato dal 66,7% del 2016 al 55,2% del 2017.

E' sicuramente importante anche la formazione sul campo che è stata effettuata per gli operatori sanitari, con particolare riguardo a quelli operanti in regime di pronto soccorso e/o rianimazione.

I dati ottenuti, disaggregati per periodo documentano, inoltre, come la percentuale di inidoneità dei campioni ammontava nel primo trimestre 2017 al 78%, decresce sino al 51% da aprile ad agosto 2017 grazie all'introduzione in uso del kit specifico per la catena di custodia e, al termine dei corsi di formazione al personale operante nelle strutture interessate, nel



**Figura 2**

Attività tossicologica pervenuta dai punti di Pronto Soccorso Aziendali nell'anno 2017 con relative criticità.

**Tabella 3**

Richieste di indagine tossicologiche dai punti di pronto soccorso aziendali negli anni 2016 – 2017 e relative non conformità della catena di custodia

	2016 (12 mesi)		2017 (al 30 novembre)	
	n.	%	n.	%
Campioni idonei	85	33,3	6,9	44,8
Campioni non idonei	171	66,7	85	55,2
Campioni totali	256	—	154	—

**Tabella 4**

Tipologie di non conformità negli anni 2016 - 2017

		2016 (%)	2017 (%)**
1	Non idoneità quali-quantitativa del campione rispetto alla richiesta d'analisi	5	5
2	Numero di aliquote insufficiente (<3)	10	5
3	Errati sistemi di etichettatura e sigillatura	50	20
4	Mancata o erronea apposizione delle firme sulle provette	20	20
5	Errata modalità di conservazione del campione durante il trasporto*v	10	40
6	Altre cause	5	10

\*Sino all'introduzione del kit specifico per la catena di custodia.

\*\*Sino al 30 novembre.

trimestre settembre-novembre 2017 diminuisce ulteriormente al 38% (Tabella 5). Ci ripromettiamo una successiva revisione delle procedure per ottimizzare ulteriormente i dati fino ad ora ottenuti.

In conclusione la catena di custodia è necessaria per garantire la tracciabilità del campione, dal prelievo alla conservazione fino allo smaltimento (32-36).

Si auspica, che l'esperienza illustrata funga da

**Tabella 5**

Percentuale di richieste idonee e non idonee provenienti dai punti di pronto soccorso aziendali nell'anno 2017

	Gennaio-Marzo kit non in uso	Aprile-Novembre kit in uso	Settembre-Novembre dopo corso di formazione
Catena di custodia non rispettata %	78	51	38
Catena di custodia rispettata %	22	49	62

spunto e testimonianza per l'applicazione di una stessa metodologia in tutta la regione Campania così da garantire, agli utenti ed agli operatori tutti, gli stessi standards operativi e qualitativi.

## BIBLIOGRAFIA

- Dominioni O. La prova penale scientifica. Gli strumenti scientifico-tecnici nuovi o controversi e di elevata specializzazione. Milano: Giuffrè Editore, 2005.
- Bossi C. La catena di custodia e la genuinità della prova nel processo penale. <http://www.avvocatinovara.com/wp-content/uploads/2013/03/La-catena-di-custodia-.pdf> (ultimo accesso: maggio 2018)
- Bertol E, Lodi F, Mari F, et al. Trattato di tossicologia Forense. Padova: CEDAM, 2000.
- Chiarotti M, De Giovanni N, Fucci N et al. Analisi tossicologiche per la ricerca di sostanze d'abuso effettuate con riferimento al DPR 309/90 su un campione di lavoratori nel periodo 1995-1999. Boll Farmacodip Alcool, 2001 [http://www.unicri.it/min.san.bollettino/bulletin\\_it/bull2001.htm](http://www.unicri.it/min.san.bollettino/bulletin_it/bull2001.htm) (ultimo accesso: maggio 2018)
- Ministero della salute, Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici, Circolare n. 3 dell'8 maggio 2003 [www.salute.gov.it/img/s/C\\_17\\_normativa\\_394\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/img/s/C_17_normativa_394_allegato.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
- Ferrara SD. Doping Antidoping. Padova: Piccin Nuova Libreria, 2004.
- Pichini S, Pacifici R. Istituto Superiore di Sanità. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. [old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee\\_Guida\\_Capelli\\_xweb.pdf](http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
- Pichini S., Pacifici R. Istituto Superiore di Sanità. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nelle urine. [old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee\\_Guida\\_Urine\\_xweb.pdf](http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
- Zuccaro P, Pichini S, Altieri I. et al. Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici – Rapporti ISTISAN 96/29 (1996). <http://old.iss.it/publ/index.php?lang=1&id=618&tipo=5>. (ultimo accesso: maggio 2018).
- Pichini S, Palmeri A, Pellegrini M. et al. Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli – Rapporti ISTISAN 99/24 (1999). <http://old.iss.it/publ/index.php?lang=1&id=488&tipo=5> (ultimo accesso: maggio 2018).
- Borriello R, Caligara M., Chiarotti M. et al. Linee guida per i laboratori di analisi delle sostanze di abuso in campioni biologici. Boll Farmacodip Alcool 2002. [http://www.unicri.it/min.san.bollettino/bulletin\\_it/bull\\_2002.htm](http://www.unicri.it/min.san.bollettino/bulletin_it/bull_2002.htm) (ultimo accesso: maggio 2018).
- Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI). Linee guida per i laboratori di analisi di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. Rev n. 3, 01/03/2010. [http://tossicologia-forense.unina2.it/dwn/LINEEGUIDA%20-%20REV.3\\_2010.pdf](http://tossicologia-forense.unina2.it/dwn/LINEEGUIDA%20-%20REV.3_2010.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018).
- Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI). Linee guida per le strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali su campioni biologici prelevati da vivente. Rev. n. 4, 6/12/2012. <http://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2015/07/LG2012.pdf> (ultimo accesso: maggio 2018)
- Pichini S, Pacifici R. Droghie e alcol: tempo di armonizzazione. Biochim Clin 2015;39:92-3.
- Pichini S, Pacifici R. Istituto Superiore di Sanità. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva. [http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee\\_Guida\\_Saliva\\_xweb.pdf](http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Saliva_xweb.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018)
- International Organization for Standardization. [www.iso.org](http://www.iso.org) (ultimo accesso: maggio 2018).
- Decreto Ministeriale 444/90. Regolamento concernente la determinazione dell'organico e delle caratteristiche organizzative e funzionali dei servizi per le tossicodipendenze da istituire presso le unità sanitarie locali. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.25 del 30-01-1991 <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1991/01/30/091G0050/sg> (ultimo accesso: maggio 2018)
- Decreto Legislativo n. 285 del 30/04/1992. Nuovo codice della strada [https://www.poliziadistato.it/statics/25/cds\\_aggiornato\\_al\\_26102011.pdf](https://www.poliziadistato.it/statics/25/cds_aggiornato_al_26102011.pdf) (ultimo accesso: maggio 2018)
- Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. Accordo, ai sensi dell'articolo 8, comma 2 dell'Intesa in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, perfezionata nella seduta della Conferenza Unificata del 30 ottobre 2007 Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.236 del 08-10-2008. <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2008/10/08/08A07139/sg> (ultimo accesso: giugno 2018).
- Intesa Conferenza Unificata, seduta del 30 ottobre 2007, In materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza. <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2007/11/15/07A09622/sg> (ultimo accesso: giugno 2018).
- Laposata C, Bortolotti F, Gottardo R. et al. Ruolo e finalità dei laboratori di farmacotossicologia forense. Biochim Clin 2017;41:258-65.
- Flanagan RJ, Connally G, Evans JM. Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. Toxicol Rev 2005; 24: 63-71.
- Verstraete AG. Detection times of drugs of abuse in blood, urine and oral fluid. Ther Drug Monit, 2004; 26: 200-5.
- Vandevenne M, Vandebussche H, Verstraete A Detection time of drugs of abuse in urine. Acta Clin Belg, 2000; 55: 323-33.
- Society of Hair Testing. Statement of the Society of Hair

- testing concerning the examination of drugs in human hair. *Forensic Sci Int* 1997;84:3-6.
26. Moeller MR, Kraemer T. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit*, 2002;24:210-21.
  27. Flanagan RJ, Connally G. Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. *Toxicol Rev*, 2005; 24: 51-62.
  28. Patrucco G, Arnelli A., Bagnati M. et al. Determinazioni di laboratorio delle sostanze psicotrope: un aggiornamento delle procedure. *Biochim Clin* 2009; 33:556-68.
  29. Society of Forensic Toxicology: forensic chain of custody [http://www.soft-tox.org/files/Guidelines\\_2006\\_Final.pdf](http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf) (ultimo accesso: marzo 2018).
  30. Chiarotti M, Borriello R, Gigli F. et al. Riflessioni e proposte operative in tema di qualità totale ed accreditamento dei laboratori di tossicologia forense. Atti del XXXIII Congresso Nazionale SIMLA Brescia 25-28 ottobre 2000.
  31. Vrenna L, Giardiello D, Morani A. et al. Modello organizzativo e ruolo del laboratorio tossicologico ad alta produttività per la gestione della farmacodipendenza del territorio metropolitano A.S.L. Napoli 1. *Biochim Clin* 2006;30:156-68.
  32. Colucci AP, Gagliano Candela R. Validità del dato analitico del laboratorio chimico clinico e tossicologico – *Boll Farmacodip Alcol* 2004; n° 3/4. [http://www.unicri.it/min.san.bollettino/bulletin\\_it/bull2004.htm](http://www.unicri.it/min.san.bollettino/bulletin_it/bull2004.htm) (ultimo accesso: maggio 2018).
  33. Lodi F, Marozzi E. *Tossicologia forense e chimica tossicologica* Milano: Libreria Cortina 1982.
  34. Vidali M., Evangelisti F., Petriccioni G. et al. Stato dell'arte delle analisi farmacotossicologiche nei laboratori di tossicologia italiani. *Biochim Clin*, 2015;39:100-7.
  35. Pacifici R, Gori P, Martucci L, et al. Considerazioni sulle matrici biologiche idonee alla valutazione dell'attualità d'uso di sostanze illecite ai fini degli articoli 186 e 187 del nuovo Codice della Strada. *Biochim Clin* 2014;38:27-31.
  36. De Giovanni N, Fucci N. Il laboratorio di tossicologia forense nell'ambito della diagnostica medico-legale. *Biochim Clin* 2006;30:98 -105.

## Il Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation (GRADE) quale metodologia sistematica e trasparente per valutare l'esame di laboratorio nella formulazione di raccomandazioni e linee guida

Valentina Pecoraro<sup>1</sup>, Paola Pezzati<sup>2</sup>, Fiamma Balboni<sup>3</sup>, Tommaso Trenti<sup>1</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC Evidence Based Laboratory Medicine

<sup>1</sup>Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

<sup>2</sup>Centro Regionale di Riferimento, Struttura Organizzativa Dipartimentale Sicurezza e Qualità in Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

<sup>3</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

### ABSTRACT

**The Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation (GRADE) methodology as systematic and transparent framework to evaluate diagnostic test value in supporting guide lines and recommendations issuing.** A multidimensional pathway based on GRADE Evidence to Decision (EtD) framework is presented. The aim of the document is to define a valid process to assess the adoption of a diagnostic test and the consequences of the decision. The framework includes three sections reflecting the main steps of GRADE EtD: formulating the relevant question, making an assessment of the evidence, and drawing conclusions. As a matter of example, the EtD framework is used to present the evidence concerning the molecular diagnosis of sepsis in neonates including seven dimensions: (1) formulating the question; (2) assessment of diagnostic test accuracy; (3) certainty of the evidence; (4) effects of test on the main patient outcome; (5) balance between the desirable and undesirable effects; (6) resource use; (7) equity, acceptability and feasibility. The example is used to better elucidate the concepts and to show how reviewers may complete each dimension with the relevant information available. Several factors could influence the final decisions: the relevance of the problem, the values of diagnostic accuracy, the effects of the test on main patient outcome; other issues may play a role. The framework consists of a comprehensive decision aid model to ensure that all important criteria are considered to explain a judgment. This approach could help health professionals to use the best available research evidence in a structured and transparent way to inform decisions in the context of laboratory medicine.

### INTRODUZIONE

L'informazione prodotta da un esame di laboratorio è un elemento fondamentale nel percorso decisionale clinico diagnostico. La scelta di usare o meno un esame per uno specifico scopo (diagnostico, terapeutico, prognostico, di screening, di monitoraggio), implica l'identificazione della relazione che esiste tra il risultato dell'esame e le azioni che conseguono all'acquisizione del risultato con l'impatto prodotto sugli esiti di cura (1). Data questa stretta connessione, le decisioni cliniche prese in merito agli esami diagnostici dovrebbero essere supportate da evidenze scientifiche che considerino tutti gli effetti decisionali più importanti e valutino le strategie

clinico-terapeutiche derivate dall'esecuzione dell'analisi (1, 2). Vi è, di conseguenza, in medicina di laboratorio la necessità di disporre di una metodologia scientifica utile a produrre raccomandazioni e linee guida (LG) di elevata qualità metodologica basata sui principi dell'Evidence Based Medicine (EBM) proponendo un adeguato modello strutturato utilizzabile dagli autori o estensori di LG. Il presente documento vuole illustrare l'utilizzo del metodo *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* (GRADE) (1) quale modello per valutare la qualità delle evidenze e produrre raccomandazioni trasparenti in merito all'utilizzo degli esami diagnostici. Il lavoro presenta sinteticamente la metodologia, che consiste in sette domini da sviluppare,

Corrispondenza a: Valentina Pecoraro, Laboratorio Tossicologia, Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica. Ospedale Civile S. Agostino Estense, Via Giardini 1355, 41126 Modena. Tel. +39 059 3961427; e-mail: valepecoraro@gmail.com

Ricevuto: 05.11.2018

Revisionato: 09.11.2018

Accettato: 02.01.2019

Publicato on-line: 04.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.004

e fornisce un esempio didattico della sua applicazione. Il metodo GRADE è nato dall'attività avviata nel 2000 da un gruppo di lavoro internazionale che aveva come scopo la definizione di un metodo rigoroso ed esplicito per la produzione di raccomandazioni cliniche. È un modello strutturato e trasversale da utilizzare nella produzione di LG ed è attualmente raccomandato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e richiesto anche dal Ministero della Salute per la produzione di LG e conseguenti raccomandazioni che possano essere riconosciute a livello nazionale (3). Infatti, la Legge 24 dell' 8.03.2017, Disposizioni in materia di sicurezza delle cure e della persona assistita, nonché in materia di responsabilità professionale degli esercenti le professioni sanitarie (Legge Gelli) stabilisce, all'articolo 5, che gli esercenti le professioni sanitarie nell'esecuzione delle prestazioni sanitarie debbano attenersi, salve le specificità del caso concreto, alle raccomandazioni previste dalle LG elaborate da enti e istituzioni pubbliche e private, da società scientifiche e associazioni tecnico-scientifiche delle professioni sanitarie iscritte in apposito elenco istituito e regolamentato con Decreto Ministeriale del 02.08.2017. Tali raccomandazioni sono pubblicate dall'ISS nel Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG), previa verifica di conformità della metodologia adottata a standard internazionali riconosciuti e resi pubblici da parte dell'Istituto stesso, e della rilevanza delle evidenze scientifiche dichiarate a supporto delle raccomandazioni (3). Il SNLG istituito con Decreto Ministeriale del 27.02.2018, gestito dall'ISS tramite il centro nazionale per l'eccellenza clinica, la qualità e la sicurezza delle cure (CNEC) è l'unico punto di riferimento e accesso per professionisti sanitari, dirigenti, amministratori, decisori, utenti e qualsiasi professionista si occupi di sanità, a un corpus di LG nazionali per la pratica clinica e la salute pubblica ordinato secondo criteri di rilevanza, non ridondanza e coerenza interna. La procedura adottata per la valutazione della qualità metodologica e dei contenuti delle LG proposte, disponibile nel manuale metodologico ISS di riferimento per la produzione di LG, vede la metodologia GRADE quale punto di riferimento indiscusso (3). In altre parole, qualsiasi LG proposta perché divenga di valore nazionale, deve essere validata metodologicamente e pubblicata dall'ISS nel SNLG e deve basarsi sul metodo GRADE.

Il GRADE è stato sviluppato per valutare, con un processo di revisione sistematica della letteratura scientifica, la qualità delle evidenze e per produrre raccomandazioni trasparenti, non solo di ambito terapeutico e prognostico, ma anche in merito agli esami diagnostici (4). In particolare, è utile sottolineare, come il metodo GRADE offra un complesso percorso strutturato in cui la qualità delle prove relative all'efficacia o meno degli esami diagnostici è valutata in ragione del loro impatto su esiti importanti di salute per i pazienti. I vantaggi di questo modello decisionale includono: la partecipazione di un gruppo multidisciplinare di esperti,

una dettagliata revisione di tutte le fonti pertinenti di buona qualità presenti in letteratura, una valutazione degli esiti ritenuti importanti sia dai pazienti sia dai decisori, un percorso trasparente, strutturato e riproducibile, dalla raccolta delle evidenze alla definizione della decisione finale.

In questo approccio metodologico, le misure di accuratezza diagnostica [sensibilità, specificità, valori predittivi, rapporto di verosimiglianza (likelihood ratio) e rapporto di probabilità (odds ratio diagnostico)] rappresentano il punto di partenza per assumere delle decisioni, tenendo sempre presente che devono essere considerati come esiti surrogati.

Nell'ambito del progetto GRADE è stato anche sviluppato l'*Evidence to Decision (EtD) framework*, strumento realizzato per lo sviluppo di un percorso che si snoda dalla valutazione delle prove alla formulazione delle raccomandazioni e delle decisioni (5, 6).

Il modello GRADE prevede alcune sezioni dettagliate che descrivono il quesito diagnostico di interesse, la valutazione delle evidenze e le conclusioni. Le informazioni necessarie sono ottenute solitamente da revisioni sistematiche recenti; il modello fornisce un esplicito documento contenente i giudizi dei membri del gruppo chiamati a produrre una LG nonché raccomandazioni in grado di guidare una decisione clinica (4, 5, 6).

Il percorso decisionale descritto è un modello trasversale che può essere applicato a qualsiasi esame diagnostico di interesse. Il GRADE implica di necessità la presenza di un gruppo di esperti scelti sia su base multiprofessionale, ad esempio medici, infermieri, rappresentanti dei pazienti, amministratori, metodologi, epidemiologi, rappresentanti delle istituzioni sanitarie regionali e nazionali, sia su base multidisciplinare specialistica, come ad esempio internisti, cardiologi, medici di medicina generale e qualsiasi specializzazione pertinente.

Se il modello può dunque essere applicato teoricamente in ogni ambito e contesto, a causa della necessità di formare gruppi costituiti da tanti professionisti diversi, il GRADE è utilizzato soprattutto dalle istituzioni sanitarie che possono disporre delle risorse necessarie a gestire la complessità di gruppi di lavoro così formati. E' dunque difficile non solo per un singolo professionista di laboratorio, ma anche per una società scientifica di medicina di laboratorio, come peraltro di qualsiasi società scientifica, produrre in prima persona LG e raccomandazioni coerenti al modello GRADE, proprio per la difficoltà di costituire e gestire un gruppo di lavoro così complesso e rappresentativo di esperti diversi. Tuttavia, la presenza di esperti di laboratorio all'interno dei gruppi chiamati a produrre LG o raccomandazioni è molto comune, ed è lecito supporre che tale presenza sarà sempre più diffusa e numerosa.

Lo scopo di questo lavoro è di fornire ai professionisti che vengono coinvolti nella valutazione di un esame diagnostico con questa metodologia, indicazioni utili e

operative per un approccio GRADE pragmaticamente corretto.

### IL PERCORSO STRUTTURATO GRADE DALLA EVIDENZA ALLA DECISIONE

A partire dal GRADE EtD framework ideato dal gruppo di lavoro GRADE (1, 4, 5, 6), abbiamo strutturato un percorso che si suddivide in tre parti (a, b, c) e comprende sette domini (a1, b1-b5, c1) secondo quanto schematizzato in Tabella 1.

La prima parte del metodo (a) definisce il quesito di interesse. Il quesito deve essere strutturato sulla base dell'acronimo PICO (popolazione, intervento, confronto, outcome), esplicitando anche eventuali sottogruppi di pazienti da considerare e l'ambito di interesse. La seconda parte (b, da b1 a b5), più articolata, prevede la descrizione delle informazioni principali per definire la specifica condizione clinica di interesse, per valutare l'accuratezza dell'esame diagnostico considerato e le evidenze recuperate attraverso la ricerca della letteratura. Gli autori sono chiamati anche ad esplicitare i criteri utilizzati per la valutazione dell'esame diagnostico per la decisione finale. L'ultima parte (c) definisce la decisione in merito all'utilizzo dell'esame.

Ogni dominio prevede la descrizione delle informazioni specifiche derivate e supportate dalle evidenze ricercate, che guidano la decisione. I professionisti utilizzano lo schema illustrato, che ricalca altre metodologie tipo griglia utilizzate nella metodologia EBM, con le informazioni bibliografiche disponibili e rigorosamente valutate.

Come paradigma didattico, viene qui di seguito illustrata l'applicazione del modello GRADE al seguente

quesito diagnostico: L'analisi molecolare è utile per diagnosticare un'infezione grave (sepsi) nei neonati?. Si tratta di un esempio di tipo educativo di applicazione del metodo, in cui gli enunciati del GRADE sono esemplificati punto per punto.

Deve essere sottolineato che il fine del quesito clinico presentato, essendo esclusivamente di applicazione didattica del metodo GRADE, non è quello di formulare raccomandazioni di contenuto validato, proprio nella consapevolezza di come nel GRADE sia vincolante la presenza di un gruppo multiprofessionale e multispecialistico, che nel caso specifico, dovrebbe comprendere almeno laboratoristi, microbiologi, pediatri, neonatologi, infettivologi, metodologi, rappresentanti delle istituzioni sanitarie, infermieri, rappresentanti dei pazienti. Una presenza monospecialistica, ovvero di specialisti di medicina di laboratorio, compromette metodologicamente già in partenza l'accettabilità della valutazione, indipendentemente dai contenuti riportati. Non di meno, il lavoro svolto e riportato nel paragrafo Applicazione dell'Evidence to Decision (EtD) framework all'esame diagnostico, nell'ambito del quesito diagnostico proposto, è corretto nella sintesi delle evidenze scientifiche e l'analisi sistematica e trasparente della letteratura prevale sulle opinioni pur autorevoli. In una situazione operativa, tali contenuti dovrebbero poi essere valutati dal gruppo multidisciplinare e multiprofessionale. Nell'esempio riportato, di conseguenza, non si traggono conclusioni, proprio perché non è nelle possibilità degli autori proporre raccomandazioni secondo il GRADE, mancando di tutte le competenze professionali necessarie, ma sono fornite le evidenze su cui basare una possibile valutazione, incluso lo schema valutativo ultimato.

#### Tabella 1

*Presentazione schematica della modalità di lavoro per valutare l'esame di laboratorio nella formulazione di raccomandazioni e linee guida.*

#### a. Definizione del quesito che guida la valutazione dell'esame

a 1. Formulazione del quesito di interesse.

#### b. Percorso di valutazione dell'esame

b 1. Valutazione dell'accuratezza in funzione di:

b 1.1. Condizione di interesse

b 1.2. Accuratezza dell'esame

b 1.3. Rischi e benefici

b 2. Valutazione delle evidenze

b 3. Importanza dell'esito

b 4. Bilanciamento tra i benefici e gli effetti indesiderati

b 5. Utilizzo delle risorse

#### c. Definizione della decisione finale relativa all'utilizzo dell'esame

c 1. Equità, accettabilità e fattibilità

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La decisione di introdurre un esame diagnostico nella pratica clinica richiede valutazioni e riflessioni complesse. Le prove disponibili derivano, nella maggior parte dei casi, da studi di accuratezza diagnostica, poiché gli studi randomizzati controllati sono molto rari in ambito diagnostico. Gli studi di accuratezza diagnostica valutano se un esame classifica i pazienti in maniera corretta o meno, e restituiscono i risultati in termini di veri positivi e negativi (VP e VN), falsi positivi e negativi (FP e FN); la stima dell'effetto dell'esame sull'esito importante da valutare, deve essere trattata di conseguenza. La decisione finale richiede che tutte le evidenze prodotte vengano considerate complessivamente per stabilire le eventuali conseguenze prodotte dall'inserimento di un esame e valutare la certezza delle evidenze (1). Gli studi che valutano gli esami diagnostici solitamente si limitano a descrivere la sensibilità e la specificità analitica, ma dovrebbero indicare il reale significato clinico del risultato ottenuto, ovvero quali ricadute, positive o negative, il risultato dell'esame possa avere sul paziente e come esso possa guidare la gestione del paziente da parte del medico. In altre parole, un esame dovrebbe essere incluso nella pratica clinica solo se ci sono prove a sostegno del miglioramento della salute del paziente in seguito all'utilizzo dell'esame stesso. L'esame diagnostico è in grado di migliorare l'esito del paziente se riduce il numero di FP e FN, favorendo una corretta diagnosi e trattamento, limitando anche la necessità di indagini successive (7). L'EtD framework proposto dal gruppo GRADE prevede non solo di considerare i dati di accuratezza diagnostica dell'esame, ma di valutare anche altri tipi di evidenze per stimare l'effetto dell'esame sugli esiti importanti per i pazienti (1). È un metodo per comunicare raccomandazioni basate sulle evidenze, utile ai decisori, ma anche ai pazienti e fornisce un quadro conciso ed accurato per informare e supportare il processo decisionale (5).

Il modello descritto in questo articolo può facilitare i decisori nel processo di sviluppo di raccomandazioni; in particolare permette di mettere in relazione tutte le prove disponibili, utilizzandole in maniera strutturata e trasparente. Il modello consente di esplicitare i criteri utilizzati per valutare gli esami diagnostici, i giudizi emessi dal gruppo multidisciplinare di esperti coinvolti, le evidenze che supportano i giudizi espressi e tutte le considerazioni formulate per supportare le decisioni. Le decisioni finali, di conseguenza, derivano da una scrupolosa e ragionata valutazione delle prove, ed i fattori che possono influenzarle sono riscontrabili principalmente nei seguenti domini: importanza della condizione di interesse, valutazione dell'accuratezza diagnostica, effetto dell'esame sull'esito principale.

La complessità del modello potrebbe costituire un limite alla sua applicazione; deve tuttavia essere considerato che avere a disposizione uno strumento il più possibile completo, facilita il lavoro dei decisori nella valutazione dei rischi e dei benefici che derivano

dall'introduzione di un esame diagnostico, oltre a favorire la trasparenza nel percorso decisionale. Per ottenere maggiori vantaggi dall'utilizzo di questo modello, è necessario avere adeguate conoscenze dell'approccio GRADE, di conseguenza è necessaria una formazione specifica per approfondire il modello GRADE e ottimizzare l'utilizzo dell'EtD framework.

In sintesi, il modello si propone come strumento pratico che mette in chiara relazione le evidenze di letteratura e le decisioni. Il modello può accrescere la qualità dei documenti prodotti e migliorare la trasparenza dei giudizi dei decisori. Questi aspetti hanno fatto sì che l'approccio GRADE e l'EtD framework siano stati adottati dalle principali organizzazioni, come l'Organizzazione Mondiale della Sanità, e attualmente siano richiesti anche dal Ministero della Salute italiano. In quest'ottica, anche le società scientifiche, in associazione con le istituzioni, sono chiamate ad utilizzare approcci strutturati come quello proposto in questo articolo, per promuovere progetti per l'utilizzo appropriato degli esami diagnostici.

## APPLICAZIONE DELL'EVIDENCE to DECISION (EtD) FRAMEWORK AD UN ESAME DIAGNOSTICO

A titolo esemplificativo e didattico, di seguito è riportata l'applicazione del modello relativo al quesito: L'analisi molecolare è utile per diagnosticare un'infezione grave (sepsi) nei neonati?

Seguendo la metodologia proposta, dopo una estensiva ricerca bibliografica, il percorso EtD è stato declinato inserendo tutte le informazioni disponibili in merito agli esami per la diagnosi molecolare di sepsi, ovvero i dati provenienti da revisioni sistematiche, LG, resoconti di organizzazioni nazionali e internazionali, di *Health Technology Assessment* (HTA).

Di seguito i dettagli dello svolgimento dell'esempio.

### Ricerca delle fonti

Dopo aver definito il quesito di interesse, è stata sviluppata una strategia di ricerca della letteratura scientifica, con l'utilizzo delle parole-chiave, elencate in Tabella 2, impiegate nelle banche dati PubMed (Clinical Queries) e The Cochrane Library. Sono stati inoltre ricercati siti rilevanti per lo specifico quesito clinico, appartenenti a società scientifiche, agenzie governative e organizzazioni nazionali e internazionali, riportati anch'essi in Tabella 2.

### Criteri di inclusione dei documenti rilevanti

Sono state incluse revisioni sistematiche, LG e resoconti di HTA che valutano le tecniche di biologia molecolare per la diagnosi di sepsi nei neonati. Sono stati considerati eleggibili i documenti che soddisfano i seguenti criteri minimi di validità interna, tratti dai criteri di *Assessing the Methodological Quality of Systematic Reviews* (AMSTAR) (8) e *International Network of*

**Tabella 2**

*Ricerca bibliografica: parole chiave utilizzate per le ricerche su database (PubMed e The Cochrane Library) ed elenco dei siti web consultati*

Parole chiave utilizzate per la ricerca in PubMed e The Cochrane Library	Sepsis
	Infection
	Pathogens
	Neonatal sepsis
	Newborn
	Infant
	Molecular assay
	Molecular diagnostic techniques
	Nucleic acid amplification techniques
	Molecular probes
	Sequence analysis
Siti web consultati di società scientifiche, agenzie governative e organizzazioni nazionali e internazionali	Agency for Healthcare and Quality (AHRQ ) <a href="https://www.ahrq.gov/">https://www.ahrq.gov/</a>
	Associazione Microbiologici Clinici Italiani (AMCLI) <a href="http://www.amcli.it/">http://www.amcli.it/</a>
	Centre for Reviews and Dissemination (CRD) databases, University of York <a href="https://www.york.ac.uk/crd/">https://www.york.ac.uk/crd/</a>
	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) <a href="https://www.escmid.org/">https://www.escmid.org/</a>
	Federazione Società Microbiologiche Europee (FEMS) <a href="https://fems-microbiology.org/">https://fems-microbiology.org/</a>
	International Network of Agencies for Health Technology Assessment (INAHTA) <a href="http://www.inahta.org/">http://www.inahta.org/</a>
	International Union of Microbiological Societies (IUMS) <a href="https://www.iums.org/">https://www.iums.org/</a>
	National Institute of health (NHI) <a href="https://www.nih.gov/">https://www.nih.gov/</a>
	Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) <a href="https://www.who.int/">https://www.who.int/</a>
	Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC) <a href="https://www.sibioc.it/">https://www.sibioc.it/</a>
Società Italiana Microbiologia (SIM) <a href="https://www.societasim.it/">https://www.societasim.it/</a>	
American Society of Microbiologists (ASM) <a href="https://www.asm.org/">https://www.asm.org/</a>	

*Agencies for Health Technology Assessment (INAHTA)* (9): definizione esplicita degli obiettivi, ricerca sistematica della letteratura con specificazione delle banche dati e siti internet consultati, e risultati basati sulla valutazione di studi primari con esplicita definizione dei criteri di inclusione.

Sono state incluse le LG che oltre ai criteri minimi di validità interna, presentavano almeno uno dei criteri di qualità relativi alla presenza di un gruppo multidisciplinare e alla descrizione della metodologia di ricerca delle evidenze (10). Le LG eleggibili, ma che non soddisfacevano almeno uno di tali criteri di qualità sono state escluse.

### Analisi critica della qualità dei documenti inclusi

La qualità delle revisioni sistematiche incluse è stata valutata mediante i criteri AMSTAR (8). La qualità delle LG incluse è stata valutata mediante lo strumento AGREE II (11). Le valutazioni conseguenti sono disponibili nella Appendice consultabile come materiale supplementare (1S).

### Selezione dei documenti e raccolta dati

Gli autori hanno esaminato i titoli e i sommari delle referenze bibliografiche identificate dalla strategia di ricerca e selezionato quelle che rispondevano ai criteri di eleggibilità. Di queste sono stati recuperati i testi integrali che sono stati valutati ai fini dell'inclusione.

### Risultati della ricerca bibliografica

La ricerca ha consentito di identificare 437 referenze bibliografiche, di cui 37 sono state considerate eleggibili. Dopo aver valutato il testo completo, sono state incluse otto revisioni sistematiche, di cui tre considerate per la compilazione del modello e cinque narrative considerate solo per la descrizione della condizione di interesse, tre LG, un resoconto HTA e una conferenza di consenso utilizzata anch'essa per la descrizione della condizione di interesse.

Dai documenti selezionati, sono state raccolte le informazioni riguardo l'obiettivo generale, i criteri di inclusione adottati, i risultati principali e le conclusioni degli autori. Le informazioni reperite sono state poi incorporate in maniera descrittiva e sintetica all'interno dei vari domini specifici riportati nel modello compilato di seguito.

I documenti recuperati riportano che l'esame di riferimento per la diagnosi di sepsi è l'emocultura, metodica la cui refertazione richiede circa 48-72 ore. Inoltre, molte culture rimangono negative anche se sono sospettate infezioni batteriche o fungine. Gli esami di biologia molecolare sono esami rapidi che lavorano direttamente sul campione dei pazienti. Si basano su tecniche di amplificazione o ibridazione del materiale genetico disponibile, consentendo di identificare correttamente il microrganismo che causa l'infezione. La possibilità di avere a disposizione una tecnica che fornisce una rapida identificazione del patogeno, può apportare dei vantaggi in termini sia di rapida diagnosi, ottimizzando la percentuale di sopravvivenza dei pazienti con sepsi, sia di precoce e appropriata terapia antibiotica, favorendo l'uso responsabile degli antibiotici, con riduzione dei costi e della tossicità (12).

## SVILUPPO DEI DOMINI

### a. Definizione del quesito che guida la valutazione dell'esame

a 1. Formulazione del quesito di interesse

Il quesito deve essere strutturato sulla base dell'acronimo PICO, specificando il problema di interesse, il ruolo dell'esame, le caratteristiche della popolazione al quale l'esame sarà applicato, possibili esami alternativi e l'outcome importante per il paziente oggetto della valutazione.

Quesito strutturato	L'analisi molecolare è utile per diagnosticare un'infezione grave (sepsi) nei neonati?
Popolazione	Neonati
Esame indice (index test)	Metodiche di analisi molecolare che includono tecniche di amplificazione [ad esempio polymerase chain reaction (PCR), estrazione e ibridazione [ad esempio fluorescenza in situ – hybridization (FISH)] degli acidi nucleici patogeni.
Esame(i) di riferimento (reference standard)	Emocultura e/o culture microbiologiche di liquidi biologici

Esami alternativi	Conteggio dei linfociti, conteggio delle piastrine, determinazione dei marcatori sierici di infezione (ad esempio proteina C reattiva, procalcitonina, citochine infiammatorie)
Condizione clinica da considerare	Sepsi batterica o funginea
Ruolo dell'esame	Esame sostitutivo Triage Esame aggiuntivo (add-on test)
Outcome principale	Accuratezza diagnostica
Ambito	Neonatologia, terapia intensiva, pediatria, microbiologia.

## b. Percorso di Valutazione

### b 1. Valutazione dell'accuratezza

#### b 1.1. Descrizione della condizione di interesse

Descrivere la patologia o la condizione di salute oggetto della valutazione, la popolazione interessata, il contesto e/o il livello di cura nel quale è utilizzato l'esame, e le implicazioni nella pratica. Nel caso in cui l'esame da valutare sia un esame di nuova introduzione, dovrebbero essere riportate le informazioni di accuratezza, gli eventuali eventi indesiderati, la disponibilità e i limiti del nuovo esame, e le conseguenze della malattia o della condizione per la società (impatto sociale), confrontandoli con le caratteristiche dell'esame in uso.

#### Descrizione

La sepsi è un'infezione sistemica grave dovuta a microrganismi patogeni che invadono tessuti, fluidi e cavità corporee, capace di scatenare una risposta immunitaria non regolata, con conseguenti danni di organi e/o tessuti. Nei neonati rappresenta una condizione grave ed è responsabile di un alto tasso di mortalità e morbidità soprattutto per soggetti con basso peso alla nascita. Il tasso di mortalità è stimato tra il 25% e 81%, a seconda della gravità dell'infezione e dei tessuti e organi interessati. L'identificazione precoce del patogeno che ha causato l'infezione (diagnosi) è fondamentale per la gestione dell'infezione e per iniziare una corretta terapia (13-,17). In uno studio che ha arruolato più di 6000 neonati con basso peso alla nascita, gli autori riportano che i neonati con sepsi avevano un rischio maggiore di sviluppare eventi avversi al follow up, tra cui paralisi cerebrale, scarsa crescita (score di Bayley) e perdita visiva, rispetto ai neonati non infetti (13). I segni clinici e sintomi di sepsi neonatale sono spesso aspecifici. L'infezione, infatti, è accompagnata da febbre, ipotermia, ipotensione, tachicardia, tachipnea, conta anomala dei linfociti (18). La sovra-diagnosi di sepsi neonatale può portare ad un inadeguato uso degli antibiotici favorendo lo sviluppo di resistenza agli antibiotici stessi. L'infezione è dovuta principalmente a batteri o funghi, molto raramente a virus. I batteri solitamente associati ad infezioni possono essere sia Gram negativi (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) sia Gram positivi (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus pneumoniae*) (14). Il gold standard per la diagnosi di sepsi è l'emocultura, la quale però richiede tempi lunghi (48-72 ore) per la corretta identificazione del patogeno, ha generalmente una bassa sensibilità nei neonati, risente di eventuali trattamenti antibiotici somministrati alla madre, che possono produrre risultati falsi negativi, e dipende dal volume di sangue raccolto dai neonati,

che spesso risulta scarso (16). Gli altri liquidi biologici che possono essere usati per la cultura microbiologica sono il liquido cefalo-rachidiano e le urine. I marcatori di infiammazione (proteina C reattiva, procalcitonina, citochine, chemochine) sono stati ampiamente studiati anche per la diagnosi di sepsi, ma risultano falsamente elevati in stati infiammatori, quali interventi chirurgici o traumi, e non forniscono informazioni riguardo la sensibilità agli antibiotici, informazioni che poi guidano la successiva terapia (16). La proteina C reattiva ha un incremento nelle prime 6-10 ore fino a raggiungere un picco 2-3 giorni dopo l'infezione. Inoltre è un fattore predittivo di emocultura positiva, con un valore predittivo positivo di 99%. La procalcitonina aumenta nelle prime 4 ore e raggiunge un massimo di concentrazione nel siero dopo 18-24 ore. Ha una sensibilità di 82% e specificità che varia da 79% a 86%. (19,20).

I metodi di biologia molecolare comprendono tecniche di amplificazione [PCR, Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)], in associazione o meno al sequenziamento dell'acido nucleico, e tecniche che si basano sull'ibridazione (microarray, FISH) (17). Il metodo più ricorrente è l'amplificazione da sangue intero che ha sensibilità e specificità sub-ottimali ma il vantaggio di ottenere il risultato in tempi brevi. Per ottenere dei volumi ragionevoli di materiale batterico da volumi ridotti di sangue intero, alcuni autori utilizzano sangue arricchito con Tryptic Soy Broth (TSB) prima dell'amplificazione. In alcuni casi l'amplificazione dell'acido nucleico batterico è effettuata solo per i campioni positivi all'emocultura, scelta questa che ottimizza l'identificazione del patogeno e fornisce informazioni utili riguardo eventuale resistenza agli antibiotici. La discreta specificità del metodo può generare dei risultati FP, questo si verifica in caso di proteina C reattiva positiva ed emocultura negativa. In alcuni casi, risultati FP possono essere generati anche dalle emocolture, in questo caso i metodi molecolari consentono velocemente di escludere una batteremia. Branched DNA signal Amplification (BDNA array), FISH e la spettrometria di massa, invece, sono metodiche che consentono l'identificazione dell'agente senza l'amplificazione, a partire da campioni positivi all'emocultura. L'introduzione di queste metodiche molecolari nella diagnostica di laboratorio necessita di alcune considerazioni in merito alla standardizzazione delle tecniche di estrazione che dovrebbero essere migliorate, e la necessità di avere dei kit applicabili alle piattaforme di laboratorio, automatizzabili e facili da usare. In USA l'incidenza di sepsi tra i neonati è aumentata da 0,56 casi per 1000 nel 1995, a 0,89 casi per 1000 (con una prevalenza doppia per quanto riguarda la sepsi grave nei nuovi nati) tra il 1995 e il 2005, mentre la mortalità intra-ospedaliera si è ridotta dal 10,3% al 9% (21).

Sulla base di quanto riportato nel riquadro precedente, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente

Il problema rappresenta una priorità?

- Sì
- No
- Non lo so

#### *b 1.2. Accuratezza dell'esame*

Descrizione dell'esame e dei suoi comparatori di riferimento, indicazioni per l'utilizzo dell'esame, fase di sviluppo dell'esame (ricerca, routine, obsolescenza), requisiti di accuratezza richiesti nel contesto di cura, valore soglia ottimale, variazione dell'accuratezza nei diversi contesti, ipotesi su eventuale miglioramento di diagnosi, prognosi, monitoraggio o gestione della malattia, a seguito dell'utilizzo dell'esame. La valutazione dell'accuratezza di un esame dovrebbe derivare dalle informazioni provenienti da una revisione sistematica di buona qualità, già pubblicata.

## Evidenze

I metodi molecolari per l'identificazione dei patogeni sono basati prevalentemente sull'ibridazione (FISH o microarray) o amplificazione (PCR), e differiscono prevalentemente per il modo di identificazione del patogeno (16). Negli studi condotti sui neonati, la sensibilità dei metodi molecolari variava da 4,1 a 100%, e la specificità da 77,2 a 100%. Questa eterogeneità era probabilmente dovuta a differenze nella metodologia e nel disegno di studio, nei metodi di estrazione del DNA, e nelle caratteristiche della popolazione studiata (16).

Una recente revisione sistematica (21) ha confrontato l'analisi molecolare con la cultura microbica del sangue e del liquido cefalo-rachidiano riportando i seguenti risultati di accuratezza con i relativi intervalli di confidenza (95%IC):

- la sensibilità complessiva è 0,90 (95% IC 0,82- 0,95)
- la specificità complessiva è 0,93 (95% IC 0,89 - 0,96) (moderata qualità delle evidenze)

Nel confronto tra l'analisi molecolare e la sola emocultura, i risultati di accuratezza sono:

- la sensibilità complessiva è 0,92 (95% IC 0,84 - 0,96)
- la specificità complessiva è 0,93 (95% IC 0,89 - 0,95)

La sensibilità media stimata per l'analisi molecolare è migliore di quella relativa agli esami alternativi utilizzati per la diagnosi di sepsi, quali la conta delle piastrine, la misura della proteina C reattiva, della procalcitonina, del tumor necrosis factor (TNF) e dell' interleuchina 6 (IL-6). La specificità media stimata è simile tra i diversi esami (21).

Sulla base di quanto sopra riportato, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente.

Quanto è accurato l'esame rispetto al gold standard?

- Inaccurato
- Accurato
- Non lo so

*b 1.3. Rischi e benefici*

Descrivere la frequenza, la gravità e la durata degli eventi avversi, nonché i gruppi di pazienti maggiormente a rischio di eventi avversi correlati alla somministrazione dell'esame. Descrivere inoltre eventuali rischi professionali che si possono verificare durante l'esecuzione dell'esame, le conseguenze dei FP e FN e dei riscontri incidentali attribuiti all'esame in termini di sicurezza per il paziente. La valutazione dei rischi e dei benefici dovrebbe essere guidata dai risultati riportati in una revisione sistematica, considerando gli effetti desiderabili e non desiderabili.

## Evidenze

Su 1000 neonati sottopeso valutati per sepsi ad insorgenza precoce (fino a 72 ore di vita), non sono stati individuati 2 casi di sepsi (FN) e trattati 69 neonati con sepsi (FP). Ugualmente, su 1000 neonati sottopeso valutati per sepsi ad insorgenza tardiva (oltre 72 ore di vita), non sono stati individuati 10 casi positivi e trattati 63 neonati senza sepsi. Per cui le attuali tecniche di analisi molecolare non hanno sufficiente accuratezza diagnostica da poter sostituire le culture microbiologiche (21).

I metodi diagnostici molecolari sembrerebbero avere un potenziale importante nella diagnostica delle infezioni in tempi rapidi e con maggior precisione. Tuttavia sono disponibili tecnologie diverse che richiedono conoscenze e abilità professionali specifiche. Sono necessari ulteriori studi prima di raccomandare queste metodiche in aggiunta o in sostituzione alle attuali metodiche di diagnosi di sepsi. (22).

Sulla base di quanto riportato sopra, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente

Rispetto allo standard di riferimento, l'uso del test è associato a:

- Maggiori effetti desiderabili
- Maggiori effetti indesiderabili
- Gli effetti sono correlati al dosaggio o alla frequenza di utilizzo
- Maggior rischio in un gruppo determinato di pazienti
- Non lo so

### *b 2. Valutazione delle evidenze*

La valutazione delle evidenze dovrebbe essere effettuata applicando il metodo GRADE, e derivare dalle informazioni provenienti da una revisione sistematica di buona qualità, già pubblicata. L'EtD framework per i test diagnostici (5) include 5 criteri utili per esprimere un giudizio e valutare la certezza delle evidenze..

Evidenze.

Tabella modificata dal riferimento 21

	Gruppo	Numero di studi	Sensibilità (95%IC)	Specificità (95%IC)	Qualità delle evidenze usando il metodo GRADE
Tutti gli studi		35	0,90 (0,82-0,95)	0,93 (0,89-0,96)	Moderata*
Tipo di test	Broad-range PCR	9	0,97 (0,86-1,00)	0,93 (0,77-0,98)	Moderata*
	Real-time PCR	9	0,86 (0,59-0,96)	0,94 (0,90-0,97)	Moderata*
	Processamento Post PCR	5	0,97 (0,40-1,00)	0,81 (0,70-0,89)	Bassa**
	Multiplex PCR	6	0,76 (0,6-0,88)	0,81 (0,70-0,89)	Bassa**
	PCR per Stafilococco	2	-	-	Bassa**
	PCR per Infezioni fungine	4	-	-	Bassa**
Tipo di sepsi	EOS	2	-	-	Bassa**
	LOS	10	0,79 (0,69-0,86)	0,94 (0,85-0,98)	Bassa**
	Misto EOS e LOS	23	0,94 (0,84-0,98)	0,93 (0,87-0,95)	Moderata*
Età gestazionale	Pretermine	5	0,89 (0,75-0,96)	0,87 (0,71-0,94)	Bassa**
	Termine e pretermine	30	0,90 (0,80-0,96)	0,94 (0,90-0,95)	Moderata*

Prevalenza	<15%	20	0,94 (0,80-0,99)	0,95 (0,92-0,97)	Moderata*
	15% - 30%	8	0,85 (0,67-0,94)	0,88 (0,79-0,94)	Bassa**
	>30%	7	0,87 (0,75-0,93)	0,93 (0,64-0,99)	Bassa**
Campione	Sangue	32	0,92 (0,84-0,96)	0,93 (0,89-0,95)	Bassa**
	Sangue e liquido cefalo rachidiano	3	-	-	Moderata*
Qualità	Solo studi di buona qualità	22	0,90 (0,76-0,96)	0,93 (0,88-0,96)	Moderata*

IC95%, intervallo di confidenza al 95%; EOS, sepsi ad insorgenza precoce; LOS, sepsi ad insorgenza tardiva; PCR, reazione a catena della polimerasi,

\*Evidenze degradate di un livello per inconsistenza

\*\*Evidenze degradate di due livelli per inconsistenza e imprecisione

Sulla base dei dati sopra riportati, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente

Qual è la qualità delle evidenze complessive relativa all'esito principale e agli eventi avversi?

- Molto bassa
- Bassa
- Moderata
- Alta
- Non ci sono studi

### b 3. Importanza dell'esito

Questo dominio fa riferimento ai benefici attesi dall'introduzione dell'esame rispetto all'esito principale di sopravvivenza/mortalità, progressione o ripresa di malattia, gravità della malattia ed altri esiti che potrebbe influenzare le decisioni successive. Nel caso dell'esame diagnostico, si fa riferimento agli eventi avversi o ad altre controindicazioni associate all'esame e alle modalità in cui l'uso dell'esame influenza gli interventi successivi. Descrivere se dal punto di vista del paziente (o di eventuali tutori legali) l'esame è utile, se il paziente è disposto a ripetere eventualmente l'esame in caso di necessità e se la conoscenza dei risultati influenza la sua qualità di vita non correlata alla patologia.

#### Evidenze

L'analisi molecolare per la diagnosi di sepsi potrebbe essere utile come esame aggiuntivo ("add-on" test), dal momento che fornisce informazioni in tempi rapidi che possono guidare le decisioni cliniche relativamente al trattamento. La raccomandazione si basa su evidenze la cui qualità è bassa o moderata (21).

L'analisi molecolare mostra dei vantaggi quando eseguita insieme alla cultura microbiologica come esame aggiuntivo. L'alta specificità dell'analisi molecolare nella valutazione dei neonati con sospetta sepsi ad insorgenza tardiva (0,94; 95% IC 0,85-0,98) comporta la riduzione della somministrazione di antibiotici aiutando i medici a prendere precocemente una decisione sull'interruzione della terapia antibiotica (21).

Gli esami molecolari rapidi, in associazione con l'emocultura, possono consentire una modifica nella gestione del paziente, che a sua volta riflette

il miglioramento dell'esito clinico in termini di mortalità e morbilità (23).  
Gli studi revisionati nel lavoro di Buehler et al riportano un chiaro beneficio in termini di riduzione della mortalità e permanenza in ospedale dei pazienti (24).

Non sembrano esserci sufficienti evidenze riguardo alla possibile modifica della terapia antibiotica di fronte ad un risultato negativo (25).

Sulla base dei dati sopra riportati, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente

Qual è l'importanza e l'utilità dell'esame rispetto all'esito primario?

- Importante
- Probabilmente importante
- Non importante
- Non ci sono informazioni

*b 4. Bilanciamento tra i benefici e gli effetti indesiderati*

Descrivere tutti gli effetti di un esame, sia quelli desiderabili sia quelli non desiderabili, che andranno ad influenzare le azioni successive. Descrivere l'effetto dell'esame sullo stato di salute del paziente e le ricadute sulle attività di vita quotidiane. Chiarire inoltre in che misura l'esame contribuisce alla diagnosi.

Evidenze

I risultati ottenuti dall'analisi molecolare sono solitamente disponibili in circa 6-8 ore e forniscono informazioni utili ad ottimizzare la terapia. Se il risultato dell'analisi molecolare è negativo, la terapia antibiotica può essere interrotta se l'esame ha alta specificità e elevato valore predittivo negativo. Se il risultato dell'analisi molecolare è positivo e l'esame ha alta sensibilità, la terapia antibiotica può essere protratta. La combinazione delle emocolture e l'analisi molecolare potrebbe migliorare la sensibilità. L'analisi molecolare permette di identificare gli organismi patogeni o rivelare la presenza di antibiotico-resistenza guidando la corretta terapia (21).

I metodi molecolari o fenotipici non consentono un accurato riconoscimento dell'agente che causa l'infezione, nonostante la rapidità nel riconoscimento delle emocolture positive. Una scorretta identificazione del microrganismo potrebbe determinare un inappropriato ed inefficace cambiamento della terapia antibiotica, con possibili ripercussioni gravi sulla salute del paziente. Inoltre, all'interno di un'emocultura potrebbero essere presenti più microrganismi, alcuni dei quali contaminanti. In questo caso l'esame rapido potrebbe non essere in grado di identificare tutti i patogeni fornendo risultati assimilabili a dei FN. Infine i test rapidi potrebbero generare dei risultati FP a causa di culture contaminate, o FN dovuti alla scarsa crescita dei microrganismi in cultura (24,25).

Sulla base dei dati sopra riportati, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente

Il rapporto tra i benefici e gli effetti indesiderati favorisce l'intervento o il confronto?

- A favore dell'intervento
- A favore dell'esame già in uso
- Non lo so

*b 5. Utilizzo delle risorse*

Valutazione dei costi, delle risorse necessarie e del rapporto costo efficacia dell'intervento.

Descrivere i tipi di risorse richieste per l'implementazione e l'uso dell'esame, installazione di attrezzature e forniture necessarie ed eventualmente la necessità di spazi dedicati. Descrivere l'impatto dell'esame sui costi indiretti sanitari. Riportare il livello di qualifica professionale, eventuali necessità di formazione e di aggiornamento del personale dedicato.

## Evidenze

Non sono stati individuati studi che eseguono una valutazione economica. I costi medici diretti dipendono dalla lunghezza della permanenza dei pazienti in ospedale, dal numero di esami di laboratorio eseguiti e ripetuti, dai costi relativi ai reattivi o ad altre procedure diagnostiche o altri costi farmaceutici sostenuti (24). Altri costi eventualmente da considerare riguardano lo spazio necessario in laboratorio e il costo dello personale dedicato.

Sulla base dei dati sopra riportati, il partecipante al gruppo di lavoro esprime il proprio giudizio compilando lo schema seguente

I costi stimati o misurati del test valutato

- Costi ingenti (>...)
- Costi moderati (<...>)
- Costi esigui (<...)
- Non lo so

### c. Definizione della decisione finale

*c 1. Equità, accettabilità e fattibilità*

Valutazione dell'introduzione dell'esame nel contesto del sistema sanitario, considerando le diverse politiche sanitarie in ambito nazionale e regionale oltre ai contesti locali. Considerare le opportunità di accesso all'utilizzo dell'esame, se l'esame può essere richiesto a tutti i pazienti, anche quelli vulnerabili, se l'utilizzo dell'esame viola/influenza l'integrità culturale e/o morale o religiosa del paziente. Reazioni e conseguenze causate dall'esame a livello sociale.

Sulla base dei dati sopra presentati, il partecipante al gruppo di lavoro deve esprimere il proprio giudizio compilando lo schema seguente

L'introduzione dell'esame influenza l'accesso alle cure?

- Sì
- Probabilmente sì
- No
- Probabilmente no
- Non lo so

L'esame è di interesse per le parti coinvolte (regione, azienda sanitaria, pazienti)?

- Sì
- No
- Non lo so

- Sulla base delle evidenze valutate, risulta fattibile l'introduzione del test?
- Sì  
 No  
 Non lo so
- L'uso dell'esame modifica le decisioni cliniche?
- Sì  
 No  
 Non lo so

## BIBLIOGRAFIA

- Schünemann HJ, Mustafa R, Brozek J, et al. GRADE Working Group. GRADE Guidelines: 16. GRADE evidence to decision frameworks for tests in clinical practice and public health. *J Clin Epidemiol* 2016;76:89-98.
- Alonso-Coello P, Schünemann HJ, Moberg J, et al. GRADE Working Group. GRADE Evidence to Decision (EtD) frameworks: a systematic and transparent approach to making well informed healthcare choices. 1: Introduction. *BMJ* 2016;353:i2016.
- <https://snlg.iss.it/> (ultimo accesso: dicembre 2018).
- Schünemann HJ, Oxman AD, Brozek J, et al. GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies. *BMJ* 2008;336:1106-10.
- Trenti T, Schünemann HJ, Plebani M. Developing GRADE outcome-based recommendations about diagnostic tests: a key role in laboratory medicine policies. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:535-43.
- Alonso-Coello P, Oxman AD, Moberg J, et al. GRADE Evidence to Decision (EtD) frameworks: a systematic and transparent approach to making well informed healthcare choices. 2: clinical practice guidelines. *BMJ* 2016; 353:i2089.
- Ferrante di Ruffano L, Hyde CJ, McCaffery KJ, et al. Assessing the value of diagnostic tests: a framework for designing and evaluating trials. *BMJ* 2012;344:e686.
- Shea BJ, Grimshaw JM, Wells GA, et al. Development of AMSTAR: a measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *BMC Med Res Methodol.* 2007 : [https://amstar.ca/Amstar\\_Checklist.php](https://amstar.ca/Amstar_Checklist.php) (ultimo accesso: settembre 2018).
- Hailey D. Toward transparency in health technology assessment. Checklist for HTA Reports. *Int J Technol Assess Health Care* 2003; 19:1-7.
- Grilli R, Magrini N, Penna A, et al. Practice guidelines developed by specialty societies: the need for a critical appraisal. *Lancet* 2000 ;355(9198):103-6.
- Brouwers M, Kho ME, Browman GP, et al. for the AGREE Next Steps Consortium. AGREE II: Advancing guideline development, reporting and evaluation in healthcare. *CMAJ* 2010;182:E839-42.
- Srinivasan L, Harris MC. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2012;24:165-71.
- Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA* 2004;292:2357-65.
- Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev* 2004 ;17:638-80.
- Tam PY, Bendel CM. Diagnostics for neonatal sepsis: Current approaches and future directions. *Pediatr Res* 2017 doi: 10.1038/pr.2017.134.
- Venkatesh M, Flores A, Luna RA, et al.. Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:1037-48.
- Simonsen K, Anderson-Berry AL, Delair SF, et al. Early-onset neonatal sepsis *Clin Microbiol Rev* 2017; 27:21-47.
- Goldstein B, Giror B, Randolph A et al. International pediatric sepsis consensus conference: definition for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric Crit Care Med* 2005;6:2-8.
- Tam PY, Bendel CM. Diagnostics for neonatal sepsis: Current approaches and future directions. *Pediatr Res* 2017 . doi: 10.1038/pr.2017.134.
- Vouloumanou EK, Plessa E, Karageorgopoulos DE et al. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2011; 37:747-62.
- Pammi M, Flores A, Versalovic J, et al. Molecular assays for the diagnosis of sepsis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 25;2:CD011926
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017;43:304-77.
- Australia and New Zealand Horizon Scanning Network. Horizon Scanning Technology Prioritising Summary. Rapid molecular assay for the diagnosis of sepsis and identification of sepsis causing pathogens. Adelaide Health Technology Assessment 2010 <http://www.horizonscanning.gov.au/> (ultimo accesso: dicembre 2018).
- Buehler SS, Madison B, Snyder SR, et al. Effectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for inpatients with bloodstream infections: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:59-103.
- NICE 2016 no. 20. Test for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi (LightCucler SeptiFast Test MGRADE, SepsisTest and IRIDICA BAC BSI assay). <https://www.nice.org.uk/> (ultimo accesso: settembre 2018).
- NICE 2016 no 51: Sepsis: recognition, diagnosis and early management. <https://www.nice.org.uk/> (ultimo accesso: settembre 2018).

## Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica.

### Parte I: termini generali

Valeria D'Argenio<sup>1,2,3</sup>, Francesca Borrillo<sup>1,2</sup>, Federica Cariati<sup>1,2,3</sup>, Federica Di Maggio<sup>1,2</sup>, Rossella Tomaiuolo<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Via G. Salvatore 486, Napoli

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Sergio Pansini 5, Napoli

<sup>3</sup>KronosDNA s.r.l., spin-off accademico dell'Università Federico II di Napoli, Via Sergio Pansini 5, Napoli

#### ABSTRACT

**Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part I: general terms.** This glossary has been conceived to help readers, who are less experienced with molecular biology, to approach this field of laboratory medicine, which is gaining increasing importance in the analytical and diagnostic processes. The glossary is organized into two separate sections: general terms of molecular biology and clinical molecular biology (molecular biology techniques, and molecular diagnostic testing). For some of the terms, a link to articles published in *Biochimica Clinica*, where these terms are employed is included. For each term the corresponding English version is reported; in addition, all the entries of the glossary are listed in the Appendix both in Italian and in English alphabetical order.

#### INTRODUZIONE

La biologia molecolare sta assumendo un ruolo centrale in molti campi della Medicina, con impatti positivi sull'intero percorso diagnostico-terapeutico. Di conseguenza, aumenta contestualmente la sua rilevanza all'interno della medicina di laboratorio con un numero crescente di pubblicazioni che riportano studi e dati di biologia molecolare. Tuttavia, gli articoli che riportano questi studi includono un importante numero di termini tecnici sempre più specifici man mano che la tecnologia evolve, all'interno dei quali il lettore poco esperto potrebbe avere difficoltà ad orientarsi.

Questo glossario è stato pensato con l'intento di agevolare il lettore ad avvicinarsi a questo campo della medicina di laboratorio.

Il glossario è diviso in due parti; la prima include i termini di base di biologia molecolare, mentre la seconda, dedicata alla biologia molecolare clinica, raccoglie sia i termini utilizzati in diagnostica molecolare che le tecniche attualmente più utilizzate nei laboratori che si occupano di questo tipo di diagnostica. Iniziamo con i termini di base.

Lo scopo del glossario è fornire un rapido riferimento

per i termini di biologia molecolare, e non è, quindi, uno strumento di approfondimento. A tal proposito, per alcuni termini è fornito un link che riporta ai lavori pubblicati su *Biochimica Clinica* negli ultimi anni, che riguardano la biologia molecolare e la biologia molecolare clinica, e nei quali il termine in questione viene usato, in modo da fornire un collegamento concreto con quanto appare in letteratura.

#### ACETILAZIONE DEGLI ISTONI (HISTONE ACETYLATION)

Reazione di addizione di gruppi acetili a determinati amminoacidi degli istoni che, di conseguenza, perdono la loro capacità di legame con il DNA. Il DNA passa in uno stato conformazionale "rilassato" che permette l'inizio della trascrizione. L'acetilazione degli istoni è uno dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell'espressione genica.

#### ACIDO NUCLEICO (NUCLEIC ACID)

Molecola polimerica costituita da unità monomeriche chiamate nucleotidi. Gli acidi nucleici sono due: l'acido

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, email: [dargenio@ceinge.unina.it](mailto:dargenio@ceinge.unina.it); tel: 081 3737909

Ricevuto: 28.11.2019

Revisionato: 04.02.2019

Accettato: 05.02.2019

Pubblicato on-line: 19.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.008

desossiribonucleico (DNA) e l'acido ribonucleico (RNA).

Il DNA è l'acido nucleico che contiene le informazioni necessarie per la sintesi di RNA e proteine. È una macromolecola composta da due catene polimeriche avvolte a doppia elica e costituite da 4 unità monomeriche o nucleotidi (vedi), contenenti lo zucchero desossiribosio e le basi azotate: adenina (A), citosina (C), guanina (G), e timina (T).

L'RNA, invece, è costituito da una singola catena di nucleotidi che hanno il ribosio come zucchero ed una delle seguenti basi azotate adenina (A), citosina (C), guanina (G), e uracile (U). L'RNA interviene nella sintesi proteica ed è il materiale genetico di molti virus. È un polimero formato da monomeri ribonucleotidici uniti covalentemente. Esistono tre tipologie principali di RNA: l'RNA messaggero (mRNA) che contiene le informazioni per la sintesi delle proteine; l'RNA ribosomale (rRNA) che fa parte dei ribosomi; e l'RNA transfer (tRNA), un gruppo di piccoli RNA necessari per la decodifica del codice genetico in amminoacidi durante la traduzione.

### ADENINA (ADENINE)

Una delle basi azotate che costituisce gli acidi nucleici (vedi); si lega alla timina (T) nel DNA ed all'uracile (U) nell'RNA.

### AGAROSIO (AGAROSE)

Polisaccaride estratto da un'alga marina, utilizzato per la preparazione di gel elettroforetici con una concentrazione variabile tra lo 0,3% e il 4%, in funzione della dimensione dei frammenti degli acidi nucleici da separare, da cui dipende la porosità ovvero il potere di risoluzione dei gel. L'agarosio fonde a 80 °C e gelifica a circa 40 °C.

### AGENTE MUTAGENO (MUTAGENIC AGENT)

Agente chimico o fisico che interagendo con il DNA, potrebbe causarne una mutazione.

### ALBERO FILOGENETICO (PHYLOGENETIC TREE)

Diagramma che rappresenta le probabili relazioni evoluzionistiche e di discendenza tra organismi.

### ALLELE (ALLELE)

Una delle forme alternative di un gene che occupa un determinato *locus genico* su ciascun cromosoma omologo. Un allele è dominante se determina il fenotipo in individui omozigoti o eterozigoti per quel carattere; si definisce recessivo se determina il fenotipo solo in individui omozigoti per quel carattere.

*(Identificazione e caratterizzazione di mutazioni in regioni regolatorie del gene malattia della fibrosi cistica. Biochim Clin 2013;37:465-9)*

### ANIMALI TRANSGENICI (TRANSGENIC ANIMALS)

Animali creati in laboratorio introducendo nella linea germinale dei frammenti di DNA estraneo a quella specie e preparato in provetta. Il DNA può essere inserito nel genoma o restare come struttura extracromosomica.

### ANTICODONE (ANTICODON)

Specifica sequenza di tre nucleotidi di una molecola di tRNA complementare ad una tripletta codone di mRNA.

### ANTIPARALLELO (ANTIPARALLEL)

I due filamenti complementari della doppia elica di DNA sono disposti in orientamento opposto per cui l'estremità 5' di un filamento è allineata con l'estremità 3' dell'altro filamento.

### APLOTIPO (HAPLOTYPE)

Il termine si riferisce ad alleli che si trovano in *loci* associati su un singolo cromosoma e che sono generalmente ereditati in modo congiunto.

*(Identikit genetico: la nuova frontiera delle indagini forensi? Biochim Clin 2010;34:120)*

### APOPTOSI (APOPTOSIS)

Morte cellulare programmata indotta da segnali che promuovono l'attivazione di specifici geni in grado di innescare una cascata di eventi "suicidi". Rappresenta un processo essenziale nel corso dello sviluppo.

### APTAMERO (APTAMER)

Oligonucleotidi o piccoli peptidi in grado di legare una specifica molecola.

### ATTIVATORE (ENHANCER)

Una proteina che stimola l'espressione di un gene, di solito agendo su un promotore per stimolare la RNA polimerasi.

### AUTOFAGIA (AUTOPHAGY)

Degradazione di organelli citoplasmatici usurati e/o danneggiati da parte dei lisosomi della cellula.

### AUTOSOMA (AUTOSOME)

Cromosoma non direttamente coinvolto nella determinazione del sesso di un organismo.

### AUTOSPLICING (SELF-SPLICING)

La capacità di un introne (vedi) di rimuovere se

stesso da un RNA attraverso un'azione catalitica che dipende soltanto dalla sequenza dell'RNA dell'introne.

### **AUTOSTOP GENETICO (GENETIC HITCHHIKING)**

Aumento della frequenza di una variante genetica di solito neutrale dovuto alla sua associazione ad una variante particolare in un altro locus sottoposto a selezione naturale.

### **BAC**

Cromosoma artificiale batterico. E' un vettore utilizzato per clonare frammenti di DNA da 100 a 300 chilobasi (kb) di dimensioni, basato sul plasmide F-factor presente in natura nel batterio *Escherichia coli*.

### **BATTERIOFAGO (BACTERIOPHAGE)**

Qualunque virus in grado di infettare i batteri. I batteriofagi sono stati le prime entità usate per studiare la genetica molecolare e sono oggi largamente usati come vettori di clonaggio. Ad esempio, il Batteriofago lambda infetta *Escherichia coli* ed è, pertanto, largamente usato come vettore di clonaggio.

### **BIAS DEL CODONE (CODON USAGE BIAS)**

Utilizzo più frequente di uno dei codoni che codifica un determinato amminoacido, per il quale esistono più codoni sinonimi.

### **BIG DATA**

Insieme di metodologie in grado di estrapolare informazioni utili (o d'interesse) da grandi quantità di dati.

### **BIOINFORMATICA (BIOINFORMATICS)**

Disciplina che utilizza metodi informatici e computazionali per lo studio di problemi biologici.

### **BIOLOGIA MOLECOLARE (MOLECULAR BIOLOGY)**

È un ramo della biologia che studia e interpreta a livello molecolare i meccanismi biologici alla base della fisiologia degli esseri viventi. La biologia molecolare si concentra sulla struttura, le proprietà e le reazioni delle proteine e degli acidi nucleici (DNA e RNA).

### **BIOTECNOLOGIE (BIOTECHNOLOGIES)**

Applicazione tecnologica che si serve dei sistemi biologici, degli organismi viventi o di derivati di questi per produrre o modificare prodotti o processi per un fine specifico.

### **CAAT**

Sequenza che è stata conservata in alcuni promotori eucariotici. Si trova a circa 40 paia di basi a monte della TATA box (vedi). Questa regione controlla la frequenza d'inizio mediante RNA polimerasi.

### **CAPPUCCIO (CAP)**

La struttura all'estremità 5' degli mRNA eucariotici. Il cappuccio viene introdotto dopo la trascrizione unendo il fosfato 5' terminale di guanosintrifosfato (GTP) alla base terminale dell'mRNA.

### **CARATTERE (CHARACTER)**

Caratteristica fenotipica ereditabile.

### **cDNA**

DNA a singolo filamento complementare a un RNA da cui è sintetizzato mediante trascrizione inversa *in vitro*.

### **CELLULA (CELL)**

Unità di base della materia vivente, separata dall'ambiente esterno dalla membrana plasmatica; è l'unità strutturale fondamentale della vita.

Una cellula procariotica (ad esempio batteri e archei) è priva di nucleo e di organuli delimitati da membrane; mentre una cellula eucariotica è provvista di nucleo e di altri organuli delimitati da membrane.

Si definisce cellula somatica ognuna delle cellule che formano i tessuti di un organismo pluricellulare, con esclusione delle cellule germinali, ovvero degli spermatozoi e delle cellule uovo, e dei loro precursori.

Una cellula staminale è una cellula non differenziata in grado di dare origine a tipi cellulari diversi e specializzati: le cellule staminali adulte sono cellule poco differenziate presenti nei tessuti di un organismo adulto, in grado di generare cellule differenziate per assicurare il ricambio cellulare.

Le cellule staminali embrionali sono cellule indifferenziate di origine embrionale che possono andare incontro ad un numero illimitato di divisioni, dando origine a tutti i possibili tipi di cellule di un organismo. Una cellula staminale si definisce "multipotente" se può dare origine a più tipi di cellule, e "pluripotente" se è capace di differenziarsi in cellule dei tre foglietti embrionali.

### **CENTIMORGAN (cM)**

Unità di misura della distanza genetica tra due loci: è indice della frequenza di ricombinazione tra gli stessi. Un cM corrisponde all'1% di possibilità che un marcatore in un locus genetico venga separato da un marcatore in un secondo locus a causa del *crossing-over* (vedi) in una singola generazione. Negli esseri umani, 1 cM equivale, in media, a 1 milione di coppie di basi nucleotidiche.

**CHAPERONINA (CHAPERONIN)**

Classe di proteine che collaborano al mantenimento e/o alla formazione della struttura tridimensionale di altre proteine prevenendone l'aggregazione.

**CHECKPOINT**

Meccanismo biochimico di controllo che impedisce alla cellula di progredire da uno stadio a quello successivo se non sono stati raggiunti obiettivi specifici e/o non sono state soddisfatte particolari richieste cellulari.

**CHEMOTASSI (CHEMOTAXIS)**

Movimento diretto di una cellula o di un organismo in una direzione corrispondente ad un gradiente di concentrazione crescente o decrescente di una determinata sostanza.

**CICLINA (CYCLIN)**

Classe di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare eucariotico.

**CICLO CELLULARE (CELL CYCLE)**

Sequenza ordinata di eventi che comprende la mitosi e l'interfase; va dal momento in cui una cellula eucariotica si divide in due cellule figlie a quando le cellule figlie si dividono nuovamente. Il ciclo cellulare comprende quattro fasi sequenziali denominate G1, S, G2 e M, oltre ad una fase G0. La fase G0 può essere permanente (cioè la cellula non si divide più) o transitoria (cellula che temporaneamente non si divide, ma può essere attivata e rientrare in fase G1). Nel loro insieme le fasi G1, S, G2 costituiscono l'interfase, mentre la fase M indica il processo di divisione cellulare per mitosi o per meiosi.

**CISTRONE (CISTRON)**

Unità genetica funzionale; è equivalente al gene.

**CITOSINA (CYTOSINE)**

Una delle basi azotate che costituisce gli acidi nucleici (vedi); si lega alla guanina (G).

**CLONE (CLONE)**

Insieme di cellule o di organismi geneticamente identici fra loro in quanto derivanti da un unico individuo.

**COATTIVATORI (COACTIVATORS)**

Fattori necessari per la trascrizione che non legano il DNA ma sono indispensabili per l'interazione tra i fattori basali di trascrizione e gli attivatori che legano il DNA.

**CODA 3' (3' UTR)**

Sequenza di RNA messaggero presente a valle della regione codificante di un gene, immediatamente dopo il codone di stop e, pertanto, non tradotta. Pur non essendo tradotta, svolge importanti attività di regolazione, quali la poliadenilazione (Poli-A tail) (vedi), l'efficienza di traduzione, la localizzazione e la stabilità dell' mRNA. Contiene inoltre siti di legame per fattori regolatori quali i microRNA (miRNA).

**CODA DI POLI-A (POLI-A TAIL)**

Lunga sequenza di alcune centinaia di nucleotidi adenina (poli-A) aggiunta al 3' dell'mRNA durante la fase di maturazione dello stesso per aumentarne la stabilità.

**CODICE GENETICO (GENETIC CODE)**

Sistema attraverso cui l'informazione genetica contenuta negli acidi nucleici viene tradotta nella sintesi di proteine cellulari.

**CODONE (CODON)**

Una specifica tripletta di nucleotidi che codifica per un amminoacido durante la sintesi proteica. In particolare, il codone di inizio (*start codon*) è utilizzato per iniziare la sintesi di una proteina; in genere, è la tripletta AUG (corrispondente all'amminoacido metionina). Si definiscono sinonimi (*synonymous*) i codoni che hanno lo stesso significato nel codice genetico (specificano lo stesso amminoacido o la terminazione di traduzione). Infine, si definiscono codoni di stop o nonsense (*stop codon* o *nonsense codon*) le triplette che indicano il segnale di terminazione della sintesi proteica ossia, le triplette UAG, UAA e UGA definite rispettivamente codone ambra, ocra e opale.

**COMPENSAZIONE DEL DOSAGGIO (DOSAGE COMPENSATION)**

Meccanismi impiegati per compensare la differenza fra la presenza di due cromosomi X in un sesso e di un solo cromosoma X nell'altro.

**COMPLEMENTARITÀ DELLE COPPIE DI BASI (COMPLEMENTARITY OF NUCLEOTIDES)**

Appaiamento di coppie di basi nucleotidiche in molecole di DNA o RNA a doppio filamento (o loro ibridi) che avviene mediante legami ad idrogeno che si instaurano tra coppie di basi complementari (adenina con timina o uracile, rispettivamente nel DNA o nell'RNA, e citosina con guanina).

**CONVERSIONE GENICA (GENE CONVERSION)**

Processo mediante il quale una sequenza di DNA sostituisce una sequenza omologa. La conversione

genica viene definita allelica, se un allele dello stesso gene sostituisce l'altro allele, o ectopica, se una sequenza di DNA ne sostituisce un'altra, in genere con elevata omologia di sequenza (vedi crossing over). Nei mammiferi, gli eventi di conversione genica sono, generalmente, di piccole dimensioni (<1 kb di lunghezza) e possono essere definite "microconversioni".

### **CORREZIONE DELLE BOZZE (PROOFREADING)**

Insieme di meccanismi coinvolti nel rilevamento e correzione di eventuali errori durante la sintesi del DNA.

### **COSMIDE (COSMID)**

Vettore di clonaggio derivato da un plasmide batterico grazie all'inserimento delle sequenze cos (sequenze di 12 basi complementari alle estremità del fago lambda e che ne permettono la circolarizzazione), che rendono il plasmide un substrato del sistema di impacchettamento del fago lambda.

### **CRISPR (CLUSTERED REGULARLY INTER-SPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS)**

Gruppi di brevi ripetizioni palindromiche regolarmente intercalate nei procarioti, che vengono trascritte e processate in corti RNA che agiscono nel meccanismo di interferenza dell'RNA.

### **CROMATINA (CHROMATIN)**

Lo stato del DNA nucleare e delle proteine ad esso associate durante l'interfase (periodo che intercorre tra una mitosi e la successiva) del ciclo cellulare eucariotico.

### **CROMOSOMA (CHROMOSOME)**

Molecola di DNA che contiene tutto o parte del materiale genetico di un organismo. È visibile come un'entità morfologica soltanto durante la divisione cellulare.

### **CROSSING-OVER**

Meccanismo di ricombinazione del materiale genetico ereditato dai due genitori, fondamentale per la variabilità interindividuale. Generalmente, consiste nello scambio di regioni genomiche tra i due cromatidi appartenenti ad una coppia di cromosomi omologhi: pertanto, non determina perdita o acquisizione di materiale genico ma solo scambi reciproci. Si parla di crossing-over ineguale (ricombinazione non reciproca) in caso di un errore di appaiamento per cui siti non equivalenti partecipano ad un evento di ricombinazione. Tale processo porta a un ricombinante con una delezione di materiale e uno con una duplicazione.

### **DECADIMENTO DELL'RNA MESSAGGERO MEDIATO DA UN NONSENSE (mRNA NONSENSE MEDIATED DECAY)**

Processo che degrada un mRNA che ha un codone non senso prima dell'ultimo esone.

### **DEGENERAZIONE DELLA TERZA BASE (CODON DEGENERACY)**

Indica la ridondanza del codice genetico in quanto diverse triplette (che si differenziano per la terza base) codificano per lo stesso amminoacido.

### **DELEZIONE (DELETION)**

Perdita di una parte o di un intero cromosoma o assenza di uno o più basi nucleotidiche in una sequenza di DNA.

### **DEMETILASI (DEMETHYLASE)**

Classe di enzimi in grado di rimuovere gruppi metilici da DNA, RNA, proteine o altre molecole.

### **DENATURAZIONE (DENATURATION)**

La conversione di una molecola dalla conformazione fisiologica ed attiva a quella inattiva. Nel DNA questo implica la separazione dei due filamenti mediante rottura dei legami idrogeno tra le basi.

### **DERIVA GENETICA (GENETIC DRIFT)**

La fluttuazione casuale (in assenza di pressione selettiva) delle frequenze alleliche nella popolazione.

### **DICER**

Ribonucleasi che processa l'RNA precursore a doppio filamento generando molecole di 21-23 nucleotidi.

### **DIFFERENZIAMENTO (DIFFERENTIATION)**

Processo di progressiva evoluzione verso una forma matura e differenziata con acquisizione di caratteri specifici come avviene nella progressiva diversificazione di cellule e tessuti dell'embrione.

### **DNA**

Vedi **ACIDO NUCLEICO**

### **DNA MICROSATELLITE (MICROSATELLITE DNA)**

Sequenze ripetute di DNA non codificante che consistono di ripetizioni di unità estremamente brevi [di solito meno di 10 coppie di basi (bp)].

**DNA MINISATELLITE (MINISATELLITE DNA)**

Sequenze ripetute di DNA che consistono di ripetizioni di unità comprese tra 10 e 100 bp.

**DNA POLIMERASI (DNA POLYMERASE)**

Enzimi che sintetizzano un filamento copia di DNA (sotto la guida di uno stampo di DNA). Gli enzimi di questo tipo possono essere coinvolti nella riparazione e/o nella replicazione del DNA.

**DNA RICOMBINANTE (RECOMBINANT DNA)**

Frammento di DNA ottenuto in laboratorio tramite l'unione di almeno due componenti. In questo modo vengono combinati materiali genici provenienti da differenti organismi.

**DNA SATELLITE (SATELLITE DNA)**

Sequenze di DNA altamente ripetute.

**DNasi (DNase)**

Enzimi che degradano il DNA.

**DOGMA CENTRALE (CENTRAL DOGMA)**

Il principio secondo cui l'informazione genetica non può essere trasferita da proteina a proteina o da proteina ad acido nucleico, ma può essere trasferita tra acidi nucleici (da DNA a RNA) e da un acido nucleico a una proteina.

**DOMINANTE NEGATIVO (DOMINANT NEGATIVE)**

Mutazione che determina un prodotto genico mutato che causa la perdita o la riduzione dell'attività del gene in cellule che contengono sia l'allele mutato che quello non mutato.

**DOMINIO (DOMAIN)**

In un cromosoma, può riferirsi o a un'entità strutturale distinta definita come una regione al cui interno il superavvolgimento è indipendente dagli altri domini, o a una regione estesa che comprende un gene espresso che ha un'aumentata sensibilità alla degradazione da parte dell'enzima DNasi I. In una proteina, si riferisce a una parte continua e discreta della sequenza aminoacidica che può essere connessa a una funzione particolare.

**DROSHA**

Un'endonucleasi che processa l'RNA principale a doppia elica generando corti precursori da circa 70 pb che verranno poi ulteriormente processati da Dicer (vedi).

**EDITING DELL'RNA (RNA EDITING)**

Insieme di processi post-trascrizionali che determinano modificazioni dell'RNA. L'editing dell'RNA è un processo post-trascrizionale utilizzato per modificare l'informazione genetica presente nel DNA e quindi generare molecole di RNA che differiscono dal loro stampo di DNA in una o più posizioni, attraverso diversi meccanismi: la conversione di una base in un'altra e l'inserzione o la delezione di nucleotidi. Tra gli effetti di tale editing abbiamo: la sostituzione di un amminoacido in una proteina, la creazione/eliminazione di codoni d'inizio e di stop, la creazione di intere *open reading frame* (vedi).

**ELEMENTI Alu (Alu SEQUENCES)**

Brevi sequenze (circa 300 bp) interdisperse nel genoma umano appartenenti alla famiglia SINE (brevi sequenze nucleari intersperse). I singoli membri contengono siti di taglio per l'enzima di restrizione Alu (dall'*Arthrobacter luteus* in cui è stato isolato per la prima volta) a ciascuna estremità (da cui il nome).

**ELICASI (HELICASE)**

Enzima che usa energia fornita dall'idrolisi di ATP per separare i filamenti di un acido nucleico a doppio filamento (duplex).

**ENDONUCLEASI (ENDONUCLEASE)**

Enzimi che tagliano i legami fosfodiesterici in una catena polinucleotidica; possono essere specifici per RNA o per DNA, a singolo o a doppio filamento.

**ENHANCER**

Sequenze di DNA che promuovono l'espressione di geni eucariotici.

**ENZIMA (ENZYME)**

Una proteina che agisce da catalizzatore, accelerando la velocità (fino a più di un milione di volte) con cui procede una reazione biochimica ma non alterando la direzione o la natura della reazione.

**EPIGENETICA (EPIGENETICS)**

Branca della biologia molecolare che studia le modifiche chimiche che influenzano il fenotipo senza alterare il genotipo.

*(Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1. Biochim Clin 2018;42: 97-102)*

*(Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino. Biochim Clin 2018;42:103-11)*

*(Shaping the epigenetic basis of Werner syndrome. Biochim Clin 2018;42:210-6)*

**ESONE (EXON)**

Segmento codificante di un gene che viene trascritto in RNA maturo.

**ESONUCLEASI (EXONUCLEASE)**

Classe di enzimi che idrolizzano singoli nucleotidi dall'estremità di una catena polinucleotidica; possono essere specifici per l'estremità 5' o per quella 3' di DNA o di RNA.

**ESOSOMI (EXOSOMES)**

Vescicole secrete dalle cellule e contenenti acidi nucleici e piccoli peptidi.

**ESPRESSIONE GENICA (GENE EXPRESSION)**

Il processo attraverso il quale l'informazione presente in una sequenza di DNA viene utilizzata per produrre un RNA o un polipeptide, mediante trascrizione e traduzione (nel caso dei polipeptidi).

**ETEROPLASMIA (HETEROPLASMY)**

Eterogeneità del genoma mitocondriale all'interno della stessa cellula.

**EST (EXPRESSED SEQUENCE TAG)**

Una breve sequenza di DNA che corrisponde alla regione terminale di un cDNA e che può essere usata per identificare un gene espresso attivamente.

**FAGO (PHAGE)**

Vedi **BATTERIOFAGO**.

**FAMIGLIA GENICA (GENE FAMILY)**

Una serie di geni, all'interno di un genoma, che codificano RNA o proteine simili o correlate da un punto di vista funzionale. I geni appartenenti ad una famiglia derivano dalla duplicazione di un gene ancestrale e successivo accumulo di cambiamenti di sequenza in copie diverse.

**FENOCOPIA (PHENOCOPY)**

Fenomeno per cui un individuo ha lo stesso fenotipo di un altro individuo avente però un genotipo differente.

**FENOTIPO (PHENOTYPE)**

È l'insieme dei caratteri morfologici e funzionali che si manifestano in una cellula o in un organismo.

**FRAMESHIFT**

Spostamento nel *frame* di lettura utilizzato per

tradurre la sequenza di base dell'mRNA. È causato dall'inserzione o dalla delezione di una o più basi nucleotidiche, con la conseguente formazione di un peptide alternativo.

**GENE (GENE)**

Unità fisica e funzionale fondamentale per l'ereditarietà. Un gene è una sequenza ordinata di nucleotidi situati in una particolare posizione su un particolare cromosoma che codifica per un prodotto funzionale specifico: una proteina o una molecola di RNA.

**GENETICA (GENETICS)**

Disciplina che studia i meccanismi ereditari e le variazioni dei geni che si verificano da una generazione a quella successiva.

**GENETICA MOLECOLARE (MOLECULAR GENETICS)**

È un ramo della genetica che studia e interpreta la struttura e la funzione dei singoli geni a livello molecolare.

**GENOMA (GENOME)**

La serie completa delle sequenze del materiale genetico di un organismo. Comprende la sequenza di tutti i cromosomi e del DNA degli organelli.

**GENOMICA (GENOMICS)**

Branca della biologia molecolare che studia la caratterizzazione molecolare e l'espressione dei genomi di diversi organismi. In particolare, si occupa della struttura, funzione ed evoluzione del genoma.

**GUANINA (GUANINE)**

Una delle basi azotate che costituisce gli acidi nucleici (vedi); si lega alla citosina (C).

**hRNA**

RNA nucleare eterogeneo.

**HNRNP**

La forma ribonucleoproteica dell'hRNA (RNA nucleare eterogeneo), in cui l'hRNA è in complesso con proteine. I pre-mRNA non vengono esportati fino a quando il processamento non è stato completato: si trovano, quindi, solo nel nucleo.

**IBRIDAZIONE (HYBRIDIZATION)**

L'appaiamento di filamenti di RNA e/o di DNA complementari tra loro.

**INTEGRAZIONE (INTEGRATION)**

Inserzione di una sequenza virale o di altro DNA in un genoma ospite mediante legami covalenti su entrambi i lati delle sequenze dell'ospite.

**INTERATTOMA (INTERACTOME)**

L'insieme completo di complessi di proteine e di interazioni proteina-proteina presenti in una cellula, tessuto od organismo.

**INTERFERENZA TRASCRIZIONALE (TRANSCRIPTIONAL INTERFERENCE)**

Fenomeno in cui la trascrizione di un promotore interferisce con quella di un secondo promotore collegato.

**INTERFERENZA DELL'RNA (RNA INTERFERENCE)**

Un processo per cui corti RNA antisense di 21-23 nucleotidi, derivati da molecole di RNA a doppio filamento più lunghe, possono regolare l'espressione dell'RNA messaggero inibendone la traduzione o mediandone la degradazione.

**INTRONE (INTRON)**

Un segmento di DNA che è trascritto, ma è poi rimosso nel trascritto maturo mediante lo *splicing* (vedi) delle sequenze esoniche che lo fiancheggiano su entrambi i lati.

**ISOLA CpG (CpG ISLAND)**

Un tratto di 1-2 kb in un genoma eucariotico ricco di residui di citosina e guanina in successione lineare (nucleotidi citosina-fosfato-guanina o CpG); si trova frequentemente nelle regioni dei promotori dei geni. Rappresentano anche regioni genomiche con livelli di metilazione (vedi) variabili.

**ISTONI (HISTONES)**

Proteine conservate che legano il DNA e che formano la subunità fondamentale della cromatina negli eucarioti. Gli istoni H2A, H2B, H3 e H4 (istoni del core) formano un nucleo ottamerico intorno al quale il DNA si avvolge per formare un nucleosoma (vedi). Gli istoni linker (ad esempio l'istone H1) sono esterni al nucleosoma.

**LIGANDO (LIGAND)**

Molecola capace di legare un sito recettoriale di un'altra biomolecola e formare un complesso in grado di svolgere o indurre una funzione biologica; ad esempio un ormone.

**LIGATION**

Legame covalente tra le due estremità di molecole di DNA o RNA.

**LOCALIZZAZIONE (LOCALIZATION)**

Determinazione della posizione di un gene o di un marcatore sul cromosoma.

**LOCUS**

Posizione di un gene o di un'altra sequenza significativa su un cromosoma.

**LOD SCORE**

È un test statistico utilizzato per effettuare analisi di associazione (linkage) in popolazioni umane, animali e vegetali. Il LOD Score misura la probabilità di riscontrare due caratteri associati sia se i due loci sono effettivamente sullo stesso cromosoma, con una determinata frequenza di ricombinazione, sia se i due loci non sono associati, quindi esclusivamente per effetto del caso.

**LONG NON CODING RNA (LONG NON CODING RNA - lncRNA)**

Sono una grande ed eterogenea classe di molecole di RNA trascritte e non codificanti con una lunghezza maggiore di 200 bp.

I lncRNA, come altri tipi di ncRNA, agiscono da regolatori dell'espressione genica ma svolgono anche funzioni regolatorie nei processi cellulari e di sviluppo.

**MAPPA CROMOSOMICA (CHROMOSOME MAP)**

Rappresentazione di tutti i cromosomi presenti nel genoma in cui sono indicate le posizioni di geni noti in base ai loro fenotipi mutanti, più altri marcatori molecolari. È basata sull'analisi della frequenza di ricombinazione. In particolare, la mappa d'associazione è una mappa cromosomica basata sulla frequenza di ricombinazione tra due geni; maggiore è la frequenza di ricombinazione tra i due geni, più essi sono distanti sul cromosoma. La mappa fisica, invece, descrive l'ordine e la distanza tra due marcatori misurata in numero di nucleotidi (bp). Infine, la mappa genica indica la posizione del DNA di un gene in cui si trovano i siti degli elementi regolatori, degli introni, degli esoni e delle mutazioni rivelate dalle frequenze di ricombinazione.

**MARCATORE DI PESO MOLECOLARE (SIZE MARKER)**

Marcatore di DNA formato da bande di peso molecolare noto che migrano a velocità diverse in un gel d'agarosio. È un riferimento per stimare il peso

molecolare delle bande elettroforetiche di campioni di DNA.

### MARCATORE GENETICO (GENETIC MARKER)

È una sequenza di DNA nota grazie alla quale è possibile individuare una regione cromosomica.

### MATURAZIONE (MATURATION)

Processo attraverso il quale l'RNA messaggero si modifica dopo la trascrizione.

### MEGABASI – Mb (MEGABASES)

È un'unità di misura della quantità di informazione genica contenuta nel DNA. Una megabase corrisponde a 106 paia di basi azotate.

### MEIOSI (MEIOSIS)

È un processo che consiste di due successive divisioni nucleari che portano alla formazione dei gameti (negli animali) o di spore sessuali (nelle piante e nei funghi) con la metà del materiale genetico della cellula d'origine. Durante la meiosi I, i cromosomi omologhi si separano ma mantengono i cromatidi. La seconda divisione meiotica, la meiosi II, è simile ad una mitosi, in cui si separano i cromatidi. La meiosi avviene in un organismo che si riproduce sessualmente e da una cellula diploide si ottengono quattro gameti aploidi.

### METABOLOMICA (METABOLOMICS)

È una branca della biologia molecolare che studia le alterazioni metaboliche dei sistemi biologici attraverso tecniche applicate alla caratterizzazione di fluidi e di campioni tissutali. L'approccio metabolomico si basa sull'identificazione globale, non guidata da ipotesi a priori, di un elevato numero di metaboliti presenti in un fluido o tessuto biologico, al fine di caratterizzare il profilo metabolico di una determinata condizione. Il fine ultimo è quello di identificare quali metaboliti o *pattern* di metaboliti possono essere utili nella discriminazione tra differenti gruppi o condizioni (ad esempio normale verso controllo, o tra differenti fenotipi clinici).

### METAGENOMICA (METAGENOMICS)

È una branca della biologia molecolare che analizza, con tecniche -omiche, campioni ambientali per caratterizzare le comunità microbiche presenti nei campioni esaminati.

### METILAZIONE DEL DNA (DNA METHYLATION)

È una delle modifiche epigenetiche del DNA coinvolta nella regolazione dell'espressione genica. Consiste nel legame di un gruppo metile ad un residuo di citosina.

*(Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1. Biochim Clin 2018;42: 97-102)*

*(Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino. Biochim Clin 2018;42:103-11)*

*(Shaping the epigenetic basis of Werner syndrome. Biochim Clin 2018;42:210-6)*

### MICROBIOMA (MICROBIOME)

È l'insieme del patrimonio genetico di una totalità di microrganismi che sono presenti in un ambiente definito. Negli ultimi anni il microbioma umano ha suscitato un particolare interesse per il suo ruolo in condizioni fisiologiche e nel determinare l'insorgenza di specifiche patologie.

### MICROBIOTA

È l'insieme dei microrganismi che sono presenti in un ambiente definito.

*(Obesità, microbiota e stress ossidativo Biochim Clin 2017;41:199-207)*

### MICROSATELLITI (MICROSATELLITES)

Marcatore molecolare di loci costituiti da unità corte (da 1 a 5 bp) e ripetute di DNA non codificante. I microsateLLiti maggiormente studiati sono le ripetizioni di dinucleotidi di CA o di GT.

*(L'analisi dello stato di instabilità dei microsateLLiti per la diagnosi e la terapia dei tumori correlati alla sindrome di Lynch Biochim Clin 2017;42:152-4)*

### MIRNA (miRNA)

Classe di RNA di piccole dimensioni (circa 20 nucleotidi) non codificanti, ma coinvolti nella regolazione dell'espressione genica.

### MITOSI (MITOSIS)

Processo con il quale si indica la divisione nucleare delle cellule eucariotiche. Prima di ogni divisione mitotica, il DNA, condensato in cromosomi, si duplica e alla fine del processo vi è la separazione dei cromosomi duplicati in modo da formare due cellule identiche.

### MISMATCH O MISPARING

Appaiamento errato, non canonico delle basi del DNA durante il processo di replicazione.

### MODIFICHE POST-TRADUZIONALI (POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS)

Modifiche che avvengono dopo la sintesi della proteina.

**MOSAICISMO (Mosaicism)**

Organismo costituito da cellule o tessuti con genotipi differenti come conseguenza di mutazioni che insorgono in una fase dello sviluppo embrionale successivo alla formazione dello zigote.

**MUTAGENO (MUTAGEN)**

E' un agente chimico o fisico capace di provocare o aumentare la frequenza di mutazioni a livello del DNA.

**MUTAZIONE (MUTATION)**

Cambiamento ereditabile nella sequenza nucleotidica di un gene in un cromosoma. Una mutazione è definita: missenso se provoca il cambio del codone e quindi della sequenza amminoacidica; non senso se porta alla formazione di un codone di stop prematuro (queste mutazioni generano proteine più corte del normale che di solito non sono funzionanti); sinonima se non provoca il cambio amminoacidico della proteina interessata; frameshift (vedi) se provoca uno slittamento del quadro di lettura degli amminoacidi. Una mutazione che riguarda una sola base nucleotidica viene definita puntiforme. Le mutazioni germinali sono ereditarie e presenti in tutte le cellule di un individuo; le mutazioni somatiche avvengono a livello del DNA in una qualunque cellula del corpo eccetto nelle cellule della linea germinale e, pertanto, non possono essere trasmesse alla progenie. Attualmente, nell'uso comune il termine mutazione viene utilizzato generalmente per indicare una variazione della sequenza nucleotidica a livello somatico, mentre a livello di linee germinali si tende sempre più ad impiegare il termine variante (vedi).

*(Indagini genetiche di nuova generazione e terapia personalizzata: l'esempio vincente della Fibrosi Cistica Biochim Clin 2018;42:44-50)*

**NICK**

Rottura di uno dei filamenti (*strand*) del DNA.

**NUCLEOTIDE (NUCLEOTIDE)**

Molecola composta da uno zucchero a cinque atomi di carbonio (ribosio o deossiribosio) legato ad una base azotata mediante un legame covalente e ad un gruppo fosfato mediante legami esteri. DNA ed RNA sono dei polimeri di nucleotidi.

**NUCLEOSOMA (NUCLEOSOME)**

Unità alla base della struttura dei cromosomi: il DNA si presenta superavvolto, due giri d'elica, attorno ad otto molecole istoniche (vedi). Al microscopio questa struttura assume la forma di una collana di perle che si avvolge su se stessa compattando il DNA all'interno di un cromosoma.

**OMOZIGOTE (HOMOZYGOUS)**

Una cellula o un organismo avente una coppia di alleli identici a livello di un locus genico.

**ONCOGENE (ONCOGENE)**

Gene potenzialmente in grado di contribuire allo sviluppo di un tumore.

**ONCOGENESI (ONCOGENESIS)**

Processo biologico responsabile della trasformazione di una cellula normale in cellula tumorale. In questo processo sono coinvolti molti meccanismi quali: la regolazione della morte cellulare, i fattori di crescita tumorali e i loro recettori, ed anche l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi vasi.

**ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICATO - OGM (GENETICALLY MODIFIED ORGANISM - GMO)**

Organismo di cui il genoma è stato modificato. Se la modifica è presente nelle cellule riproduttive, sarà trasmessa alla discendenza.

**ORF (OPEN READING FRAME)**

Letteralmente "quadro di lettura", consente di codificare un'intera proteina. E' una sequenza di DNA che comincia con un codone d'inizio e termina con un codone di stop e ovviamente rappresenta la porzione codificante del gene.

**PLEIOTROPIA (PLEIOTROPY)**

E' un fenomeno genetico nel quale un singolo gene è capace d'influenzare molteplici aspetti apparentemente non correlati.

**PLOIDIA (PLOIDY)**

Il numero di serie complete di cromosomi in una cellula; ogni serie si indica con la lettera N. Gli organismi aploidi contengono una sola serie di cromosomi nelle loro cellule somatiche, i diploidi due ed i poliploidi più di due. L'autopoliploidia è la poliploidizzazione che deriva da errori mitotici o meiotici all'interno di una specie.

**POLIMORFISMO (POLYMORPHISM)**

Variazione nella sequenza di DNA presente in più dell'1% della popolazione generale. Un polimorfismo può coinvolgere un singolo nucleotide (SNP) o una breve sequenza distinguibile in base alle differenze nella lunghezza dei frammenti coinvolti (RFLP).

*(Polimorfismo I/D del gene per l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE): gene della longevità o fattore di rischio nella patologia ipertensiva? Biochim Clin 2013;37:461-4)*

**POLIPEPTIDE (POLYPEPTIDE)**

Singola catena di amminoacidi differenti uniti da un legame peptidico.

**POST-GENOMICA (POST-GENOMICS)**

Fase della ricerca biologica e biomedica, successiva alla conclusione del Progetto Genoma, che si basa sulle conoscenze acquisite dalla mappatura del genoma umano.

**FPRE-mRNA**

Precursore dell'mRNA che, dopo alcuni processi di maturazione, diventa RNA messaggero.

**PROMOTORE (PROMOTER)**

È una regione di DNA costituita da sequenze-consenso alle quali si lega l'RNA polimerasi per iniziare la trascrizione.

**PROTEASI (PROTEASE)**

Enzima capace di catalizzare la reazione di rottura di un legame peptidico.

**PROTEINA (PROTEIN)**

Macromolecola biologica formata da catene di amminoacidi legati da un legame peptidico con uno specifico ordine. Sono presenti in tutte le cellule e rappresentano una componente fondamentale delle cellule.

**PROTEOMICA (PROTEOMICS)**

Disciplina che si occupa dello studio di tutte le proteine presenti nel proteoma e di tutte le loro forme modificate. Lo scopo è quello di comprendere quali sono i vari meccanismi alla base delle malattie, definirne le alterazioni e identificare potenziali proteine segnale.

**PSEUDOGENE (PSEUDOGENE)**

Sequenza di nucleotidi simile a quella di un gene, ma generalmente non espressa. Può rappresentare un elemento favorente l'insorgenza di alterazioni nel gene funzionale (con il quale può condividere fino al 98% di omologia di sequenza), per effetto di meccanismi di microconversione (vedi).

**RBP (RNA - binding protein)**

Proteina con uno o più domini di legame per l'RNA.

**RECETTORE (RECEPTOR)**

Proteina, transmembrana o intracellulare, che lega

una molecola extracellulare (ligando) e grazie a questa interazione, altamente specifica, è capace d'innescare delle reazioni a cascata all'interno della cellula.

**READTHROUGH**

Processo implicato nella trascrizione o nella traduzione quando l'RNA polimerasi o il ribosoma, in presenza di una mutazione dello stampo, ignorano un segnale di stop.

**REGIONE REGOLATORIA (REGULATORY REGION)**

Una sequenza di DNA deputata al controllo dell'espressione genica.

**REPLICAZIONE DEL DNA (DNA REPLICATION)**

Processo molecolare attraverso il quale viene prodotta una copia di una molecola di DNA.

**REPLICONE (REPLICON)**

È la porzione di DNA formata da più geni che si duplicano in blocco.

**REPLISOMA (REPLISOME)**

Struttura multiproteica costituita da un complesso di enzimi e proteine, ognuno con un compito ben preciso, che si assemblano in corrispondenza della forca di replicazione per la replicazione del DNA.

**REPRESSORE (REPRESSOR)**

Molecola proteica che si lega ad una regione specifica di DNA per impedire la trascrizione di un gene adiacente o di un operone, direttamente o tramite un induttore.

**RETROTRASPOSONE (RETROTRANSPOSON)**

Sequenze di DNA in grado di trasciversi autonomamente.

**RIBONUCLEASI (RIBONUCLEASE)**

Classe di enzimi che idrolizzano i legami fosfodiesterici tra i ribonucleotidi dell'RNA.

**RIBOZIMA (RIBOZYME)**

RNA con attività catalitica.

**RICOMBINASI (RECOMBINASE)**

Enzima che catalizza una ricombinazione sito-specifica.

**RICOMBINAZIONE GENETICA (GENETIC RECOMBINATION)**

Vedi **CROSSING OVER**.

**RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA (CHROMATIN REMODELING)**

Processo attraverso il quale avviene lo spostamento e la riorganizzazione dei nucleosomi.

**RINATURAZIONE (RENATURATION)**

Processo che permette sia alle proteine globulari sia alla doppia elica di DNA di riacquistare la struttura nativa e l'attività biologica, dopo essere state denaturate ad alte temperature o da valori estremi di pH.

**RIPARAZIONE DEL DNA (DNA REPAIR)**

Processi biologici che correggono cambiamenti accidentali nel DNA.

**RIPETIZIONI IN TANDEM (TANDEM REPEATS)**

Regioni di DNA costituite da sequenze di due o più nucleotidi ripetuti.

**RNA**

Vedi **ACIDO NUCLEICO**.

**RNA POLIMERASI (RNA POLYMERASE)**

Enzima che catalizza la sintesi di un RNA nascente utilizzando uno stampo di DNA.

**SEQUENZA DI DNA (DNA SEQUENCE)**

Specifica sequenza di nucleotidi che costituisce la struttura primaria del DNA e veicola le informazioni del codice genetico. Una sequenza del DNA è codificante se definisce direttamente la sequenza di amminoacidi della corrispondente proteina, in caso contrario è definita non codificante. Inoltre, una sequenza è detta: palindromica, se è costituita da successioni di basi invertite e ripetute; regolatoria, se rappresenta il sito di legame di una proteina che regola l'espressione di specifici geni; sovrapposta, se trasporta le informazioni relative a diversi geni usando una diversa cornice di lettura. Le sequenze altamente ripetute (*Repeated sequences*, *Repeats*) sono sequenze di DNA presenti in un gran numero di copie nel genoma.

**SEQUENZA PEPTIDICA (PEPTIDE SEQUENCE)**

È l'ordine nel quale sono disposti i residui amminoacidici in un peptide.

**SOSTITUZIONE (SUBSTITUTION)**

Un tipo di variante genica dovuta alla sostituzione di un nucleotide in una sequenza di DNA da parte di un altro nucleotide o alla sostituzione di un amminoacido in una proteina con un altro amminoacido.

**SPLICEOSOMA (SPLICEOSOME)**

Grosso complesso di RNA e proteine che eseguono lo splicing dell'RNA nelle cellule eucariotiche.

**SPLICING**

Meccanismo di rimozione degli introni dall'RNA messaggero con la successiva formazione di un filamento di RNA costituito esclusivamente da regioni codificanti.

**TATA box**

Una sequenza canonica, ricca di A-T presente circa 25 bp a monte del punto di inizio dell'unità di trascrizione della RNA polimerasi II eucariotica. La TATA box insieme ad altre sequenze canoniche formano un sito particolare detto promotore "core".

**TELOMERASI (TELOMERASE)**

Ribonucleoproteina che aggiunge sequenze ripetitive non codificanti di DNA all'estremità 3' dei telomeri.

**TELOMERO (TELOMERE)**

Regione terminale dei cromosomi costituita da sequenze ripetute di DNA.

**TIMINA (THYMINE)**

Una delle basi azotate che costituisce gli acidi nucleici (vedi); si lega all'adenina (A) nel DNA.

**TOPOISOMERASI (TOPOISOMERASE)**

Sono un gruppo di enzimi presenti in tutte le cellule eucariotiche e procariotiche, che svolgono un ruolo importante in processi quali la replicazione e la trascrizione del DNA.

**TRASCRIPTASI INVERSA (REVERSE TRANSCRIPTASE)**

Un enzima che utilizza un filamento di RNA per generare un filamento complementare di DNA.

**TRASCRIPTOMICA (TRANSCRIPTOMICS)**

Disciplina che studia l'intero profilo degli RNA messaggeri (mRNA) trascritti in un organismo, in un organo o in un particolare tessuto.

**TRIPLETTA (TRIPLET)**

Vedi **CODONE**.

**URACILE (URACIL)**

Una delle basi azotate che costituisce gli acidi nucleici (vedi); si lega all'adenina (A) nel RNA.

**VARIANTE GERMINALE (GERMINAL VARIANT)**

Variante di una sequenza nucleotidica che può presentarsi a livello di tutte le cellule germinali o solo in una porzione di esse (mosaicismo, vedi) a seconda dello stadio di sviluppo dell'embrione in cui si è sviluppata e che verrà trasmessa alla prole. In base all'effetto funzionale prodotto, una variante germinale può essere considerata benigna (se non produce alcun effetto sulla funzione cellulare e, di conseguenza, nessuna alterazione del fenotipo) o patogenetica (se determina alterazioni della funzione cellulare e, di conseguenza, specifiche alterazioni del fenotipo). Talvolta, il significato di una variante non può essere correlato ad un significato clinico e/o ad un fenotipo preciso. In questo caso, la variante viene definita a significato incerto (*Variant of Uncertain significance – UCV*).

**VARIANTE SOMATICA (SOMATIC VARIANT)**

Variante a livello delle sequenze nucleotidiche che colpiscono le cellule somatiche, le cui conseguenze sono differenti a seconda degli effetti funzionali prodotti e che non saranno ereditate dalle generazioni successive.

**WILD TYPE**

Gene che esprime il fenotipo normale per un determinato carattere.

**CONFLITTO DI INTERESSI**

Nessuno.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levin M, Losick R. *Biologia molecolare del gene*. Zanichelli 2015, VI ed.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli 2016, VI ed.

## APPENDICE

Indice analitico dei termini considerati nel glossario elencati in ordine alfabetico in base alla lingua italiana e inglese. Si riporta anche la corrispondente traduzione.

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Acetilazione degli istoni	Histone acetylation	Adenine	Adenina
Acido nucleico	Nucleic acid	Agarose	Agarosio
Adenina	Adenine	Allele	Allele
Agarosio	Agarose	ALU sequences	Elementi ALU
Agente mutageno	Mutagenic agent	Anticodon	Anticodone
Albero filogenetico	Phylogenetic tree	Antiparallel	Antiparallelo
Allele	Allele	Apoptosis	Apoptosi
Animali transgenici	Transgenic animals	Aptamer	Aptamero
Anticodone	Anticodon	Autophagy	Autofagia
Antiparallelo	Antiparallel	Autosome	Autosoma
Aplotipo	Haplotype	BAC	BAC
Apoptosi	Apoptosis	Bacteriophage	Batteriofago
Aptamero	Aptamer	Big data	Big data
Attivatore	Enhancer	Bioinformatics	Bioinformatica
Autofagia	Autophagy	Biotechnologies	Bioteologie
Autosoma	Autosome	CAAT	CAAT
Autosplicing	Self-Splicing	Cap	Cappuccio
Autostop genetico	Genetic hitchhiking	Character	Carattere
BAC	BAC	cDNA	cDNA
Batteriofago	Bacteriophage	Cell	Cellula
Bias del codone	Codon usage bias	Cell cycle	Ciclo cellulare
Big data	Big data	Central dogma	Dogma centrale
Bioinformatica	Bioinformatics	Chaperonin	Chaperonina
Biologia molecolare	Molecular biology	Checkpoint	Checkpoint
Bioteologie	Biotechnologies	Chemotaxis	Chemotassi
CAAT	CAAT	Chromatin	Cromatina
Cappuccio	Cap	Chromatin remodeling	Rimodellamento della cromatina
Carattere	Character	Chromosome	Cromosoma
cDNA	cDNA	Chromosome map	Mappa cromosomica
Cellula	Cell	Cistron	Cistrone
Centimorgan	cM	Clone	Clone
Chaperonina	Chaperonin	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	CRISPR
Checkpoint	Checkpoint		
Chemotassi	Chemotaxis		
Ciclina	Cyclin		
Ciclo cellulare	Cell cycle		Centimorgan
Cistrone	Cistron		Coattivatori
Citosina	Cytosin		Codone
Clone	Clone		Degenerazione della terza base
Coattivatori	Coactivators		Bias del codone
Coda 3'	3'UTR		Complementarietà delle coppie di basi
Coda di Poli-A	Poli-A tail		di basi
Codice genetico	Genetic code		Cosmide
Codone	Codon		Isola CpG
Compensazione del dosaggio	Dosage compensation		Crossing-over
Complementarietà delle coppie di basi	Complementarity of nucleotides		Ciclina
Conversione genica	Gene Conversion		Citosina
Correzione delle bozze	Proofreading		Delezione
Cosmide	Cosmid		Demetilasi
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats		Denaturazione
	Chromatin		DICER
Cromatina	Chromatin		Differenziamento
Cromosoma	Chromosome		DNA
Crossing-over	Crossing-over		Metilazione del DNA
Decadimento dell'RNA messaggero mediato da un nonsenso	mRNA nonsense mediated decay		DNA polimerasi
Degenerazione della terza base	Codon degeneracy		Riparazione del DNA
Delezione	Deletion		Replicazione del DNA
Demetilasi	Demethylase		DNAsi
Denaturazione	Denaturation		Sequenza di DNA
			Dominio
			Dominante negativo
			Compensazione del dosaggio
			Drosha
			Endonucleasi
			Attivatore

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Deriva genetica	Genetic drift	Epigenetics	Epigenetica
DICER	DICER	Exon	Esone
Differenziamento	Differentiation	Exonuclease	Esonucleasi
DNA	DNA	Exosomes	Esosomi
DNA microsatellite	Microsatellite DNA	Expressed sequence tag	EST
DNA minisatellite	Minisatellite DNA	Frameshift	Frameshift
DNA polimerasi	DNA polymerase	Gene	Gene
DNA ricombinante	Recombinant DNA	Gene conversion	Conversione genica
DNA satellite	Satellite DNA	Gene expression	Espressione genica
DNAsi	DNase	Gene family	Famiglia genica
Dogma centrale	Central dogma	Genetics	Genetica
Dominante negativo	Dominant negative	Genetic code	Codice genetico
Dominio	Domain	Genetic drift	Deriva genetica
Drosha	Drosha	Genetic hitchhiking	Autostop genetico
Editing dell'RNA	RNA editing	Genetic marker	Marcatore genetico
Elementi ALU	ALU sequences	Genetic recombination	Ricombinazione genetica
Elicasi	Helicase	Genome	Genoma
Endonucleasi	Endonuclease	Genomics	Genomica
Enhancer	Enhancer	Germinal variant	Variante germinale
Enzima	Enzyme	GMO(Genetically modified organism)	Organismo Geneticamente Modificato (OGM)
Epigenetica	Epigenetics	Guanine	Guanina
Esone	Exon	Haplotype	Aplotipo
Esonucleasi	Exonuclease	Helicase	Elicasi
Esosomi	Exosomes	Heteroplasmy	Eteroplasmia
Espressione genica	Gene expression	Histone	Istone
Eteroplasmia	Heteroplasmy	Histone acetylation	Acetilazione degli istoni
EST	Expressed sequence tag	hnRNP	hnRNP
Fago	Phage	homozygous	Omozigote
Famiglia genica	Gene family	hRNA	hRNA
Fenocopia	Phenocopy	Hybridization	Ibridazione
Fenotipo	Phenotype	Integration	Integrazione
Frameshift	Frameshift	Interactome	Interattoma
Gene	Gene	Intron	Introne
Genetica	Genetics	Ligand	Ligando
Genetica molecolare	Molecular genetics	Ligation	Ligation
Genoma	Genome	Localization	Localizzazione
Genomica	Genomics	Locus	Locus
Guanina	Guanine	LOD Score	LOD Score
hRNA	hRNA	Long non coding RNA	Long non coding RNA
hnRNP	hnRNP	Maturation	Maturazione
Ibridazione	Hybridization	Molecular biology	Biologia molecolare
Integrazione	Integration	mRNA nonsense mediated decay	Decadimento dell'RNA messaggero mediato da un non senso
Interattoma	Interactome	Megabases-Mb	Megabasi-Mb
Interferenza trascrizionale	Transcriptional interference	Meiosis	Meiosi
Interferenza dell'RNA	RNA interference	Metabolomics	Metabolomica
Introne	Intron	Metagenomics	Metagenomica
Isola CpG	CpG island	Microbiome	Microbioma
Istone	Histone	Microbiota	Microbiota
Ligando	Ligand	Microsatellites	Microsatelliti
Ligation	Ligation	Microsatellite DNA	DNA microsatellite
Localizzazione	Localization	Minisatellite DNA	DNA minisatellite
Locus	Locus	Mismatch o misparing	Mismatch o misparing
LOD Score	LOD Score	miRNA	miRNA
Long non coding RNA	Long non coding RNA	Mitosis	Mitosi
Mappa cromosomica	Chromosome map	Molecular genetics	Genetica molecolare
Marcatore di peso molecolare	Size marker	mRNA	mRNA
Marcatore genetico	Genetic marker	Mosaicism	Mosaicismo
Maturazione	Maturation	Mutagen	Mutageno
Megabasi-Mb	Megabases-Mb	Mutagenic agent	Agente mutageno
Meiosi	Meiosis	Mutation	Mutazione
Metabolomica	Metabolomics	Nick	Nick
Metagenomica	Metagenomics	Nucleic acid	Acido nucleico
Metilazione del DNA	DNA methylation	Nucleotide	Nucleotide
Microbioma	Microbiome	Nucleosome	Nucleosoma
Microbiota	Microbiota	Oncogene	Oncogene
Microsatelliti	Microsatellites	Oncogenesis	Oncogenesi
miRNA	miRNA	Open reading frame	ORF
Mitosi	Mitosis		
Mismatch o misparing	Mismatch o misparing		
Enzima	Enzyme		

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Modifiche post-traduzionali	Post-translational modifications	Peptide sequence	Sequenza peptidica
Mosaicismo	Mosaicism	Phage	Fago
mRNA	mRNA	Phenocopy	Fenocopia
Mutageno	Mutagen	Phenotype	Fenotipo
Mutazione	Mutation	Phylogenetic tree	Albero filogenetico
Nick	Nick	Pleiotropy	Pleiotropia
Nucleotide	Nucleotide	Ploidy	Ploidia
Nucleosoma	Nucleosome	Poli-A tail	Coda di Poli-A
OGM (Organismo Geneticamente Modificato)	Genetically modified organism (GMO)	Polymorphism	Polimorfismo
Omozigote	Homozygous	Polypeptide	Polipeptide
Oncogene	Oncogene	Post-genomics	Post-genomica
Oncogenesi	Oncogenesis	Post-translational modifications	Modifiche post-traduzionali
ORF	Open reading frame	PRE-mRNA	PRE-mRNA
Pleiotropia	Pleiotropy	Promoter	Promotore
Ploidia	Ploidy	Proofreading	Correzione delle bozze
Polimorfismo	Polymorphism	Protease	Proteasi
Polipeptide	Polypeptide	Protein	Proteina
Post-genomica	Post-genomics	Proteomics	Proteomica
PRE-mRNA	PRE-mRNA	Pseudogene	Pseudogene
Promotore	Promoter	Readthrough	Readthrough
Proteasi	Protease	Receptor	Recettore
Proteina	Protein	Recombinant DNA	DNA ricombinante
Proteomica	Proteomics	Recombinase	Ricombinasi
Pseudogene	Pseudogene	Regulatory region	Regione regolatoria
RBP	RNA- binding protein	Renaturation	Rinaturazione
Recettore	Receptor	Replicon	Replicone
Readthrough	Readthrough	Replisome	Replisoma
Regione regolatoria	Regulatory region	Repressor	Repressore
Replicazione del DNA	DNA replication	Retrotrasposon	Retrotrasposone
Replicone	Replicon	Reverse transcriptase	Trascrittasi inversa
Replisoma	Replisome	Ribonuclease	Ribonucleasi
Repressore	Repressor	Ribozyme	Ribozima
Retrotrasposone	Retrotrasposon	RNA	RNA
Ribonucleasi	Ribonuclease	RNA- binding protein	RBP
Ribozima	Ribozyme	RNA editing	Editing dell'RNA
Ricombinasi	Recombinase	RNA interference	Interferenza dell'RNA
Ricombinazione genetica	Genetic recombination	RNA polymerase	RNA polimerasi
Rimodellamento della cromatina	Chromatin remodeling	Satellite DNA	DNA satellite
Rinaturazione	Renaturation	Self-Splicing	Autosplicing
Riparazione del DNA	DNA repair	Size Marker	Marcatore di peso molecolare
Ripetizioni in tandem	Tandem repeats	Somatic variant	Variante somatica
RNA	RNA	Spliceosome	Spliceosoma
RNA polimerasi	RNA polymerase	Splicing	Splicing
Sequenza di DNA	DNA sequence	Substitution	Sostituzione
Sequenza peptidica	Peptide sequence	Tandem repeats	Ripetizioni in tandem
Sostituzione	Substitution	TATA box	TATA box
Spliceosoma	Spliceosome	Telomerase	Telomerasi
Splicing	Splicing	Telomere	Telomero
TATA box	TATA box	Thymine	Timina
Telomerasi	Telomerase	Topoisomerase	Topoisomerasi
Telomero	Telomere	Transcriptional interference	Interferenza trascrizionale
Timina	Thymine	Transcriptomics	Trascrittomica
Topoisomerasi	Topoisomerase	Transgenic animals	Animali transgenici
Trascrittasi inversa	Reverse transcriptase	Triplet	Tripletta
Trascrittomica	Transcriptomics	Uracil	Uracile
Tripletta	Triplet	Wild type	Wild type
Uracile	Uracil	3'UTR	Coda 3'
Variante germinale	Germinal variant		
Variante somatica	Somatic variant		
Wild type	Wild type		

## Presentazione documento intersocietario: SIBioC-AIOM-SIF-SIAPEC/IAP

Negli ultimi anni è ormai ampiamente accettato che l'analisi genomica giochi un ruolo di elevato potenziale nel chiarire le cause delle malattie e nel contribuire a migliorare la qualità di vita. Le conoscenze derivanti dal completamento del sequenziamento del genoma umano, inclusa l'individuazione di quelle varianti genetiche responsabili delle differenze fenotipiche tra gli individui, hanno permesso di acquisire nuovi dati importanti che permetteranno di cambiare anche molti approcci diagnostici e terapeutici nel prossimo futuro. In particolare, le tecnologie di sequenziamento massivo in parallelo (NGS) hanno espanso le nostre capacità di effettuare ricerche e studi clinici translazionali, arrivando ad un modello sempre più vicino alla cosiddetta Medicina di Precisione. Al momento attuale, lo screening di mutazioni definite *druggable*, cioè corrispondenti ad un target molecolare su cui indirizzare specifici farmaci, sta diventando una pratica quasi routinaria per i pazienti oncologici e per diversi tipi di tumori in molte parti del mondo. L'impiego di test di screening multigenici specifici per patologia, basati sulle tecnologie NGS, rappresenta un importante modello di efficienza in termini di valutazione costo/efficacia ed iniziano a diffondersi in modo popolare nelle comunità cliniche. Unitamente a queste tipologie di analisi, stanno entrando in clinica altre nuove promettenti metodiche, basate su tecnologie mini o non-invasive, che permettono di identificare mutazioni *druggable*, consentendo di seguire la malattia e la sua evoluzione, in termini di eventuale cambio del fenotipo correlato all'insorgenza di nuove varianti nel genoma o alla scomparsa di quelle che lo rendevano sensibile al trattamento. Questo approccio dinamico, basato su un concetto generalmente definito biopsia liquida altro non è che il monitoraggio molecolare, cellulare o subcellulare del paziente attraverso un prelievo di sangue, da cui isolare le diverse componenti molecolari (acidi nucleici, DNA tumorale) o subcellulari (esosomi, microparticelle o microvescicole) che rappresentano un potenziale informativo di importanza straordinaria per il futuro della medicina molecolare e di precisione. In realtà, tale concetto è vecchissimo perché l'esame emocromocitometrico è il primo esempio di biopsia liquida, e ha da sempre costituito un campo di attività proprio della medicina di laboratorio. Pertanto, nel prossimo futuro, più che parlare di biopsia liquida, sarà opportuno usare il concetto di "Profilazione molecolare di acidi nucleici circolanti, in diverse matrici biologiche liquide (sangue, saliva, urine, liquidi cavitari)".

Gli approcci tecnologici correlati a tali tipologie di analisi stanno mostrando margini enormi di sviluppo, non solo in termini di sensibilità e specificità, ma anche di armonizzazione delle procedure in un'ottica orientata alla diagnostica, oltre che alla ricerca translazionale. Il ruolo della medicina di laboratorio sarà quindi fondamentale nella definizione dei percorsi di standardizzazione e di validazione analitica e clinica dei nuovi biomarcatori tracciabili sulle suddette matrici.

Il documento intersocietario SIBioC-AIOM-SIF-SIAPEC/IAP, rappresenta lo stato dell'arte sull'impiego dei test su biopsia liquida prendendo in esame diversi aspetti: Definizione, Applicazioni cliniche, Problematiche pre-analitiche, Manipolazione del cell-free DNA (estrazione, quantificazione, conservazione), Metodiche per lo studio delle mutazioni, NGS, Refertazione. Al momento, le applicazioni cliniche riguardano i pazienti con *non-small cell lung carcinoma*, mentre le prospettive future sono relative al tumore metastatico del colon retto.

L'obiettivo del documento, che subirà periodici aggiornamenti sulla base delle nuove evidenze che emergeranno dalla scienza, è quello di armonizzare le procedure tra i centri che erogano tali tipologie di analisi.

Ettore Capoluongo, (Roma) Coordinatore del Gruppo di Studio SIBioC Biologia Molecolare  
Francesco Salvatore, CEINGE, Università Federico II, Napoli

## Raccomandazioni per l'esecuzione di indagini molecolari su biopsia liquida in oncologia

Ettore Capoluongo<sup>1</sup>, Massimo Barberis<sup>2</sup>, Lucio Crinò<sup>3</sup>, Romano Danesi<sup>4</sup>, Marzia Del Re<sup>4</sup>, Stefania Gori<sup>3</sup>, Antonio Marchetti<sup>2</sup>, Caterina Marchiò<sup>2</sup>, Nicola Normanno<sup>3</sup>, Carmine Pinto<sup>3</sup>, Antonio Russo<sup>3</sup>, Anna Sapino<sup>2</sup>, Andrea Sartore Bianchi<sup>3</sup>, Mauro Truini<sup>2</sup>, Tiziana Venesio<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica-Divisione Italiana della International Academy of Pathology (SIAPEC-IAP)

<sup>3</sup>Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM- SIBioC)

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

### ABSTRACT

**Recommendations for using of molecular assays on liquid biopsy: the first document provided by intersociety Group AIOM, SIF, SIAPEC-IAP, SIBioC.** Liquid biopsy in cancer patients is mainly based on the analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) enriched from biological fluids. This approach has more recently been proposed for the detection of oncogenic alterations in blood, cerebrospinal fluid (CSF), or urine through the use of sensitive technologies, mainly digital PCR (ddPCR) and massive parallel sequencing (MPS). Liquid biopsies have the advantage of overcoming some of the drawbacks associated with tumor biopsies, being blood samples easy to obtain from patients. Plasma ctDNA may better represent the total landscape of oncogenic alterations found across all tumor sites. Several commercially available liquid biopsy platforms based on MPS technology are currently analytically validated, with sensitivities, specificities, false negative rates, false positive rates, positive predictive values, and negative predictive values evaluated in comparison with tissue. The specificity of ctDNA is generally high while the sensitivity varies between different platforms. However, these data have not yet led to the incorporation of ctDNA into routine clinical practice. The present Recommendation represents a synthesis of the main evidences supporting use of liquid biopsy based assays in clinical setting. This inter-society approved document was prepared by a panel of expert belonging to four scientific societies who tried to provide the main useful information for the implementation of liquid biopsy-based test in clinical and laboratory practice.

### BIOPSIA LIQUIDA: DEFINIZIONE

Con il termine di biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato del tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili a fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia con specifici farmaci antitumorali. L'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, rappresenta ad oggi il principale approccio di biopsia liquida impiegato nella pratica clinica. Tuttavia, è possibile che nel futuro altri derivati del sangue, quali le cellule tumorali circolanti, l'RNA circolante ed i microRNA (miRNA), le piastrine, gli esosomi, come pure altri fluidi biologici quali le urine e il liquido cefalorachidiano, possano essere utilizzati nella pratica clinica

per avere ulteriori informazioni rispetto a quelle ottenibili mediante l'analisi del ctDNA. La quota di cf/ctDNA può risultare variabile sia dal punto di vista del momento di raccolta del campione che dalla condizione clinica del paziente.

Nell'attuale pratica clinica, l'analisi della biopsia liquida è generalmente riferita all'identificazione di mutazioni *driver* presenti nel ctDNA derivanti sia dal tumore che dalle cellule tumorali circolanti. Il ctDNA è tuttavia una frazione, a volte estremamente esigua, del cfDNA totale che è possibile isolare dal plasma dei pazienti neoplastici e che contiene anche DNA derivante da cellule non-trasformate.

Alcuni sistemi commerciali (con marchio CE-IVD) reperibili sul mercato europeo ed italiano riportano come target il ctDNA mentre altri il cfDNA, dato che quando si effettua l'analisi non si ha certezza della presenza di

Corrispondenza a: Ettore Capoluongo, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS, Università Cattolica, Roma  
ettoredomenico.capoluongo@policlinicogemelli.it

Ricevuto: 25.11.2018

Accettato: 02.01.2019

Pubblicato on-line: 04.02.2019

DOI: 10.19186/BC\_2019.005

DNA di origine tumorale fino all'eventuale rilevazione di una mutazione.

Per questo motivo, nel presente documento si farà riferimento al cfDNA più in generale, ed al ctDNA in caso di positività per le mutazioni oggetto dell'analisi.

La biopsia liquida presenta alcuni evidenti vantaggi rispetto a quella tradizionale effettuata sul tessuto, ovvero:

- la procedura non è invasiva, in quanto si tratta di un semplice prelievo di sangue pressoché privo di complicanze;
- può essere ripetuta nel tempo per monitorare l'evoluzione molecolare della malattia, sebbene non esista ad oggi evidenza che indirizzi a modificare la scelta terapeutica, in assenza di progressione clinica di malattia;
- è in grado di rappresentare in maniera più esaustiva rispetto alla biopsia tissutale l'eterogeneità molecolare della malattia contenendo, almeno potenzialmente, DNA tumorale derivante dalle diverse aree di uno stesso tumore e dalle possibili sedi di malattia.

La biopsia liquida presenta però anche alcuni limiti:

- la quantità di ctDNA nel contesto del cfDNA è spesso estremamente limitata, in funzione sia del volume che delle localizzazioni di malattia, e ciò può risultare in falsi negativi;
- in presenza di eterogeneità tumorale, la biopsia liquida fornisce scarse informazioni sulla rappresentatività nel contesto del tumore del biomarcatore individuato.

## APPLICAZIONI CLINICHE DELLA BIOPSIA LIQUIDA

Il principale campo di applicazione della biopsia liquida ad oggi è rappresentato dall'identificazione di fattori predittivi in pazienti con malattia avanzata. Tuttavia, è possibile che nel prossimo futuro queste indicazioni vengano estese, con particolare riguardo all'identificazione della malattia minima residua in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico radicale.

Per quest'ultima applicazione sono però necessari ulteriori studi e miglioramenti tecnici e di standardizzazione, prima che essa possa essere direttamente importata nella pratica clinica.

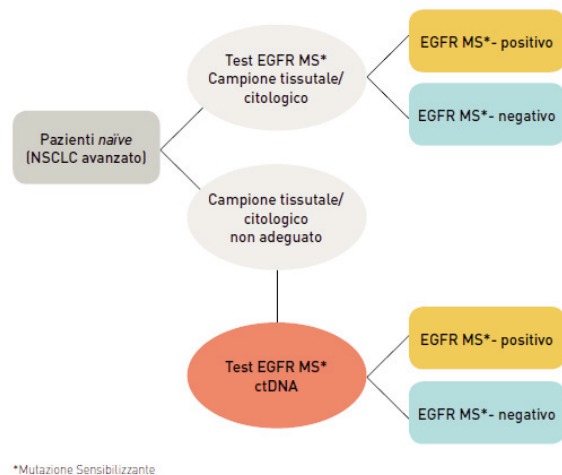
La biopsia liquida è al momento principalmente utilizzata per l'analisi mutazionale del gene dell'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) in stadio avanzato. In particolare, esistono due diversi scenari in cui il test EGFR su biopsia liquida trova attuale indicazione.

## L'analisi mutazionale dell'EGFR al momento della diagnosi in pazienti naïve con NSCLC avanzato

La determinazione dello stato mutazionale del gene EGFR su campione tissutale/citologico ottenuto mediante biopsia o intervento chirurgico al momento della diagnosi è attualmente raccomandata in tutti i pazienti con NSCLC, stadio IIIB-C e IV, ad eccezione dei pazienti fumatori con istotipo squamoso, per la scelta della migliore strategia terapeutica (vedi Linee Guida AIOM Tumori toracici)<sup>1</sup>. Tuttavia, dati recenti suggeriscono che circa il 25% delle biopsie polmonari standard non riesca a fornire una quantità/qualità di materiale adeguato all'analisi molecolare.

Molteplici studi e meta-analisi hanno valutato l'accuratezza diagnostica dell'analisi del ctDNA per l'identificazione delle più frequenti mutazioni attivanti del gene EGFR (delezioni esone 19, L858R dell'esone 21) in pazienti naïve con NSCLC avanzato.

Nel complesso questi studi hanno dimostrato una buona specificità del test EGFR su plasma, in genere superiore al 90%. La sensibilità risulta invece essere inferiore, con oscillazioni tra il 50% e l'80% in funzione della tecnologia impiegata.



**Figura 1.** Algoritmo del test EGFR in pazienti naïve con NSCLC avanzato  
\*Mutazione Sensibilizzante

### Raccomandazione 1

Sulla base di tali evidenze la valutazione dello stato mutazionale del gene EGFR su biopsia liquida è attualmente raccomandata come possibile alternativa all'analisi su tessuto tumorale nei pazienti con nuova diagnosi di NSCLC avanzato in cui la quantità e/o qualità del tessuto disponibile non siano sufficienti per effettuare le analisi molecolari previste.

<sup>1</sup>Per le indicazioni terapeutiche, è possibile consultare la Linee Guida AIOM, disponibile come materiale supplementare (1S)

**L'analisi mutazionale del gene EGFR al momento della progressione di malattia a EGFR-TKI (tyrosine kinase inhibitor) in pazienti con NSCLC avanzato**

La recente approvazione ed ammissione a rimborsabilità da parte dell'Agenzia Italiana del Farmco (AIFA) del primo inibitore di terza generazione di EGFR (Determina AIFA Gazzetta Ufficiale n.184 dell'8.08.2017), per il trattamento di pazienti con NSCLC localmente avanzato o metastatico positivo per la mutazione T790M, rende necessaria la rivalutazione dello stato mutazionale del gene EGFR al momento della progressione radiologica dopo trattamento con un EGFR-TKI, in modo tale da definire la migliore strategia terapeutica.

I risultati dello studio AURA hanno dimostrato come la progressione libera da malattia dei pazienti stratificati per la presenza della mutazione T790M in base al test eseguito su tessuto oppure su biopsia liquida sia sovrapponibile, confermando quindi la possibilità di utilizzo del test su ctDNA. Va comunque considerato che la sensibilità e la specificità del test per la T790M appaiono in generale inferiori rispetto alle mutazioni sensibilizzanti dell'EGFR.

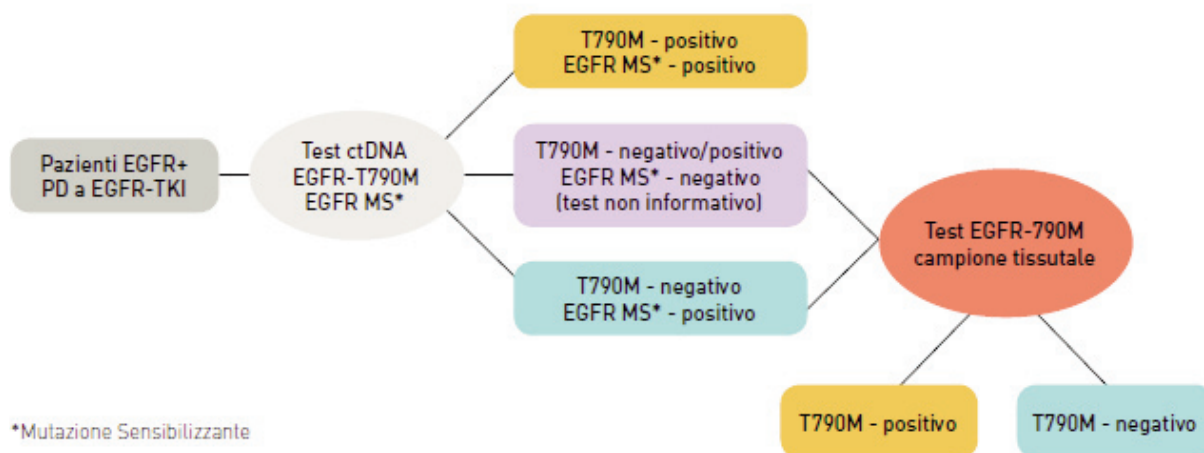
**Raccomandazione 2**

*Data la sua non-invasività e rapidità di esecuzione, il test T790M mediante biopsia liquida è attualmente impiegato in diversi centri come primo approccio diagnostico in tutti i pazienti con NSCLC avanzato EGFR-positivo in progressione dopo trattamento con EGFR-TKI. Tuttavia, a causa del rischio di falsi negativi associati a tale metodica, tutti i pazienti nei quali l'analisi mutazionale su cfDNA risulti negativa devono essere sottoposti ad analisi mutazionale su tessuto tumorale prelevato mediante re-biopsia, in modo tale da definire la migliore strategia terapeutica. Prima di procedere alla biopsia tessutale, si può eventualmente prendere in considerazione la ripetizione della biopsia liquida.*

Per garantire una migliore interpretazione del test, oltre alla T790M deve essere anche eseguita la valutazione della mutazione sensibilizzante di origine. In caso di assenza di tale mutazione, il test dovrà essere considerato non-informativo in quanto il prelievo non contiene quantità sufficienti di ctDNA. A tale riguardo, molteplici studi, e una recente meta-analisi, hanno chiaramente evidenziato come la sede delle metastasi tumorali influenzi in modo significativo l'accuratezza diagnostica dell'analisi mutazionale del gene EGFR eseguita su ctDNA. La sensibilità di tale metodica nella determinazione sia delle mutazioni attivanti che della mutazione di resistenza T790M del gene EGFR può infatti variare dall'80% in presenza di metastasi extra-toraciche al 50% in presenza di localizzazioni esclusivamente intra-toraciche.

**Tabella 1**  
NSCLC avanzato: interpretazione del risultato del test EGFR su biopsia liquida in pazienti in progressione dopo EGFR TKI

Mutazione EGFR sensibilizzante	T790M	Interpretazione
+	+	T790M positivo
+	-	T790M negativo. La biopsia tessutale è raccomandata.
-	+	T790M positivo. L'analisi deve essere ripetuta per escludere possibili falsi positivi.
-	-	Campione non informativo. I livelli di ctDNA sono troppo bassi. Ripetere prelievo o procedere alla biopsia tessutale.



\*Mutazione Sensibilizzante

**Figura 2.**  
Algoritmo del test EGFR in pazienti con NSCLC avanzato in progressione dopo EGFR-TKI

Al fine di incrementare le possibilità di successo della biopsia liquida, l'analisi dovrebbe essere eseguita al momento dell'evidente progressione di malattia, quando sono maggiori le possibilità che il DNA tumorale sia rilasciato nella circolazione.

Infine, non esistono ad oggi evidenze da studi prospettici sull'opportunità di interrompere il trattamento con EGFR-TKI in caso di comparsa di mutazione T790M nella biopsia liquida in assenza di progressione di malattia.

### Prospettive future: applicazione clinica della biopsia liquida nel tumore del colon-retto metastatico

Numerosi studi hanno dimostrato la fattibilità di eseguire l'analisi *RAS* su biopsia liquida come potenziale sostituto dell'analisi su tessuto tumorale nel carcinoma del colon-retto (CCR) metastatico. La concordanza tra i due approcci è, negli studi più moderni,  $\geq 90\%$  e, se da una parte vi è ulteriore margine di miglioramento in termini di sensibilità, dall'altra bisogna tenere conto che:

- il tumore e il sangue periferico sono due tessuti distinti e pertanto non è ragionevole attendersi una concordanza perfetta;
- le discrepanze osservate in termini di specificità, assumendo il tessuto tumorale come riferimento, trovano giustificazione nel fatto che la biopsia liquida è in grado di superare l'eterogeneità spaziale e temporale che limitano l'analisi tissutale. Inoltre, la biopsia liquida offre i vantaggi di un approccio relativamente non invasivo e più duttile, sia per la possibilità di effettuare più facilmente la determinazione dello stato mutazionale in base al momento esatto dell'intervento terapeutico con anti-*EGFR*, sia per il ridotto tempo di risposta.

Tuttavia, alcune importanti considerazioni limitano l'importazione *tout court* della biopsia liquida nella clinica quale sostituto per l'analisi mutazionale di *RAS* nel carcinoma del colon-retto ai fini dell'esclusione dalla terapia con cetuximab e panitumumab. In primo luogo, risulta difficile l'interpretazione dei risultati negativi del test che potrebbero essere condizionati dalle concentrazioni di cfDNA e dalla sensibilità delle metodiche ed essere quindi falsi negativi. Inoltre, quest'analisi non è ancora controllata da programmi di VEQ quali quelli messi in atto per l'analisi tissutale. Infine, non esistono sufficienti evidenze cliniche per stabilire in termini quantitativi quale sia la soglia percentuale di alleli *RAS* mutati determinata su sangue periferico che conferisca resistenza alla terapia con anti-*EGFR*, visto che la conoscenza attuale si basa su analisi svolte su tessuto tumorale. Pertanto, l'analisi dello stato di *RAS* del tumore per la scelta terapeutica deve essere effettuata come gold standard sul tessuto tumorale in tutti i casi in cui questo sia possibile e vicariata dall'analisi mediante biopsia liquida solo nei rari casi di tessuto insufficiente/inaccessibile. Infine, per quanto riguarda l'impiego della biopsia liquida per monitorare la

risposta a farmaci anti-*EGFR*, questa deve essere oggi considerata unicamente come indagine di ricerca e non trova attuale applicazione nella pratica clinica.

### PROBLEMATICHE PRE-ANALITICHE: DAL PRELIEVO DI SANGUE AL cfDNA

Il cfDNA può essere estratto da diversi liquidi biologici. Tuttavia, le procedure maggiormente standardizzate nella pratica clinica riguardano l'isolamento del cfDNA dal sangue periferico.

La quantità di DNA che è possibile estrarre dal sangue periferico è spesso molto limitata, nella misura di pochi ng/mL, di cui il ctDNA è solo una frazione. Infatti, la concentrazione del DNA target nel plasma dipende da diversi fattori, tra cui: il carico di malattia, i livelli di espressione della mutazione nelle cellule del tumore primitivo, la velocità di rilascio del ctDNA nel torrente circolatorio e i livelli di DNA rilasciati da cellule non trasformate (ad esempio, in conseguenza di processi infiammatori che si instaurano nel tessuto sano che circonda il tumore o di lisi dei leucociti dopo il prelievo di sangue). Per questi motivi la fase pre-analitica deve essere attentamente controllata.

Un primo problema che può inficiare la qualità del campione è costituito dall'emolisi che può generarsi durante la flebotomia: è necessario, pertanto, che il prelievo di sangue sia effettuato da personale altamente qualificato.

Il cfDNA può essere isolato dal siero o dal plasma. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'uso del plasma è da preferirsi al siero; in quest'ultimo, infatti, il processo di coagulazione causa il rilascio di DNA genomico derivante dai leucociti. Non esistono al momento indicazioni conclusive sulla quantità di sangue da impiegare ai fini diagnostici ed in routine di laboratorio. Tuttavia, molti kit diagnostici indicano la quantità minima di plasma necessaria per l'analisi.

Il prelievo può essere raccolto in tubi standard K2- o K3-EDTA oppure impiegando tubi contenenti speciali fissativi, in grado di stabilizzare il sangue e il cfDNA per diversi giorni. Se il prelievo è effettuato impiegando tubi standard, si deve tenere conto di due fattori importanti:

- il cfDNA ha una breve emivita, stimata in circa 2,5 ore;
- diversi studi hanno dimostrato che superate le 3 ore dal prelievo si può verificare una lisi dei leucociti con conseguente rilascio di DNA germinale che determina una diluizione del DNA tumorale. Pertanto, il sangue raccolto in tubi contenenti solo EDTA può essere conservato prima dell'isolamento del plasma per un massimo di 3 ore a temperatura ambiente. La conservazione del sangue alla temperatura di 4 °C non previene la lisi dei leucociti.

Nei casi in cui non sia possibile processare il campione entro le 3 ore dal prelievo, si raccomanda l'utilizzo di tubi contenenti specifici conservanti in grado di stabilizzare sia il cfDNA che i leucociti. Tuttavia, questi tubi garantiscono, in genere, la conservazione del prelievo solo in un range limitato di temperatura (16-

24°C). Pertanto, è importante assicurarsi che queste temperature siano rispettate in caso di trasporto del campione.

Per l'eliminazione dei residui cellulari e per ottenere un campione idoneo alle successive analisi, il plasma deve essere isolato mediante centrifugazione, assicurandosi di aver completamente allontanato il contaminante leucocitario derivante dal *buffy coat*. Esistono diversi protocolli di centrifugazione. È consigliabile eseguire una prima centrifugazione a bassa velocità (1200-1600 g) per evitare la lisi dei leucociti ed una successiva centrifugazione del soprannatante ad elevata velocità ( $\geq 3000$  g) per rimuovere tutti i contaminanti. Le centrifugazioni devono essere eseguite senza freno. È suggerito anche l'impiego di una centrifuga refrigerata (4°C).

Il plasma ottenuto può essere conservato a -20 °C per brevi periodi (~ 1 mese) o, per periodi più prolungati, a -80 °C, temperatura che garantisce una maggiore stabilità del DNA. Tuttavia, all'aumentare del periodo di conservazione diminuisce la quantità totale di cfDNA che è possibile estrarre, soprattutto se il campione dovesse essere sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento.

### ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E CONSERVAZIONE DEL cfDNA

Esistono molti metodi per l'estrazione del cfDNA, che comprendono sia l'utilizzo di kit commerciali che di protocolli sviluppati dai laboratori. A causa della piccola quantità e della natura molto frammentata del cfDNA nel plasma (<1.000 bp), non dovrebbero essere utilizzate metodiche di estrazione validate su campioni tissutali o su altre matrici biologiche. Il metodo di estrazione deve essere molto affidabile e deve generare quanto più DNA possibile del campione in esame, per non compromettere il risultato dell'analisi e generare risultati falsi negativi o positivi.

Per l'estrazione e la purificazione del cfDNA da plasma sono oggi disponibili vari kit commerciali dedicati a questo specifico uso. Questi kit sono in genere basati sull'utilizzo di colonnine dotate di membrane di silice, in associazione con pompa a vuoto, oppure sull'impiego di biglie magnetiche, per la cattura degli acidi nucleici.

Questi sistemi sono corredati da protocolli di semplice esecuzione e permettono di estrarre da 1 a 24 campioni, freschi o congelati, simultaneamente, e catturare frammenti di cfDNA da plasma a partire da un minimo di 10  $\mu$ L a un massimo di 10 mL di campione. In generale, si ritiene che 2 mL di plasma sia la quantità minima necessaria in grado di fornire risultati accurati utilizzando le diverse metodiche di estrazione. Inoltre, la maggior parte dei kit sopra citati contiene reagenti o, in generale, dispositivi, in grado di concentrare l'eluato in un volume flessibile di eluzione (20-150  $\mu$ L).

Una volta estratto, il cfDNA deve essere sottoposto a quantificazione, in modo da ottimizzare il processo di amplificazione e di conoscere se le successive analisi molecolari a partire dal cfDNA estratto possono essere

possibili.

L'accuratezza nella fase di quantificazione può essere ottenuta con sistemi di elettroforesi capillare oppure fluorimetrici. In generale, i kit di estrazione sopra citati consentono di ottenere campioni di cfDNA di alta qualità e con una concentrazione superiore a 5 ng/ml. La quantità di DNA estratto è comunque influenzata dallo stato di malattia e dal momento del prelievo.

La conservazione ottimale del cfDNA ne consente un utilizzo anche a distanza di tempo per poter eseguire ulteriori indagini molecolari, previo esplicito consenso informato da parte del paziente. Il processo richiede una strumentazione adeguata, tra cui congelatori a -20°C/-80°C, dispositivi di controllo grafico della temperatura, sistemi di allarme acustico, controlli di qualità del materiale biologico conservato.

### METODICHE PER LO STUDIO DELLE MUTAZIONI NEL ctDNA

#### Polymerase Chain Reaction Real Time (Real Time PCR)

L'analisi di mutazioni puntiformi oppure di piccole inserzioni/delezioni su ctDNA può essere condotta tramite utilizzo di tecnologie di *Real Time PCR*, spesso modificate per incrementare la sensibilità dell'analisi. Ad esempio, esistono in commercio kit per ctDNA basati sulla tecnologia *Amplification Refractory Mutation System (ARMS)/SCORPION* che rilevano le mutazioni a carico degli esoni 19, 20 e 21 di *EGFR*. Questi kit permettono la co-amplificazione di uno o più alleli mutati e di un gene di controllo endogeno. Inoltre, una specifica miscela di oligonucleotidi di controllo consente la valutazione della qualità e quantità del DNA presente nei campioni. L'analisi con questi kit permette di rilevare basse percentuali di allele mutato in presenza di elevate quantità di DNA genomico *wild-type* mediante amplificazione con sonde sequenza-specifiche marcate con FAM ed HEX, che possono raggiungere un limite di rilevazione (LOD) anche inferiore allo 0,5%, con differenze tra le varie mutazioni identificate.

#### PCR digitale

La PCR digitale (dPCR) è un'evoluzione di ultima generazione della PCR di cui esistono due piattaforme tecnologiche: *droplet digital PCR* – (ddPCR) e *Beam, Emulsion, Amplification, Magnetics* (BEAMing dPCR). Entrambe le metodiche si basano sulla ripartizione del campione in migliaia di goccioline (*droplets*) omogenee in un'emulsione olio-acqua; la successiva amplificazione dell'emulsione contenente il DNA permette la discriminazione del DNA target grazie all'uso di sonde fluorescenti.

Queste caratteristiche sono di grande rilevanza nell'ambito dell'analisi del ctDNA, laddove è necessario ricercare ed amplificare rare molecole di DNA tumorale in presenza di un grande eccesso di DNA germinale *wild-type*. Infatti, la ripartizione del campione in

goccioline ha la funzione di ridurre la competizione tra il DNA mutato tumorale e il DNA *wild-type*, aumentando la specificità e la sensibilità dell'analisi. In questo modo l'abbondanza relativa del DNA target mutato rispetto al *wild-type* viene aumentata.

La quantità di DNA richiesta per l'amplificazione in dPCR è di 3 ng (con un intervallo di 50 fg-100 ng) e di 3-30 ng per la BEAMing dPCR.

La ddPCR è caratterizzata da un'unica fase di amplificazione del DNA target, che avviene all'interno di circa 20.000 goccioline, uguali per dimensione e volume, formatesi dall'emulsione olio-acqua, e dall'elaborazione finale dei dati tramite la statistica di Poisson. La BEAMing dPCR, invece, prevede una fase di pre-amplificazione del cfDNA utilizzando PCR convenzionale per amplificare il target di interesse; successivamente i prodotti di amplificazione generati vengono ripartiti in migliaia di goccioline omogenee in un'emulsione olio-acqua con aggiunta di microsferine magnetiche a cui i prodotti di PCR restano fisicamente legati per poi essere facilmente separati usando un magnete. L'elaborazione finale dei dati avviene tramite citometria a flusso.

Esistono in commercio saggi per la determinazione delle mutazioni a carico degli esoni 18-21 di EGFR mediante le tecniche di dPCR. La sensibilità e la specificità dei test con ddPCR e BEAMing dPCR sono, rispettivamente, dello 0,1% e dello 0,01%. Seppur l'approccio con BEAMing dPCR sembri avere sensibilità più elevata, in letteratura è frequentemente riportata una specificità più bassa rispetto alla ddPCR (87% versus 97%, rispettivamente).

#### Raccomandazione 3 Protocollo di dPCR

- Le reazioni dPCR devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per la fase di estrazione del cfDNA e dell'analisi dei prodotti di amplificazione, usando opportune precauzioni per evitare contaminazioni (camice dedicato, guanti, puntali con filtro e così via). In ogni caso, va predisposta un'area dedicata alle procedure di preparazione in dPCR.

- L'esecuzione della ddPCR prevede una prima fase in cui si prepara la soluzione contenente il DNA, la "master mix" e le sonde. Questa soluzione viene poi trasferita in un'apposita cartuccia, all'interno della quale viene dispensato l'olio per formare l'emulsione. La cartuccia viene poi introdotta nell'apposito generatore di goccioline a formare le gocce contenute nell'emulsione olio-acqua. Il passaggio successivo prevede il trasferimento dell'emulsione dalla cartuccia alla piastra da 96 pozzetti, per procedere poi con la reazione di amplificazione.

- Per ogni analisi devono essere previsti un controllo positivo di amplificazione (ad esempio, utilizzando un campione di cfDNA precedentemente validato) e un controllo negativo (ossia, la miscela di reazione priva di "template" di DNA).

- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di dPCR in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non mutato da linee cellulari nelle quali lo stato mutazionale di EGFR sia noto. In alternativa, si può ricorrere a campioni di riferimento certificati che garantiscono una corretta determinazione di sensibilità, specificità e LOD.

- L'analisi dei risultati avviene grazie all'uso di un lettore connesso a un computer in cui uno specifico software è in grado di trasformare il segnale da analogico a digitale e rilevare le goccioline negative (prive del DNA target e/o del DNA di riferimento) e positive (che contengono l'allele target) in ciascun campione grazie alle varie fluorescenze rilevate.

Nella ddPCR, le goccioline negative e quelle positive, vengono contate singolarmente e la frazione di goccioline positive in un campione determina la concentrazione del DNA target espresso in copie/μl. Il software di analisi è in grado di dare informazioni riguardo al numero totale di goccioline generate (per una buona reazione queste dovrebbero essere >11.000) considerando il numero di gocce positive per la mutazione e positive per l'allele *wild-type*. I risultati possono essere elaborati per fornire la concentrazione della mutazione come copie/ml, frazione allelica, rapporto tra gli alleli e *fractional abundance*.

Infine, la presenza di componenti come etanolo o paraffina (come quella utilizzata in alcuni tubi per preservare la lisi cellulare) possono interferire con la formazione dell'emulsione rendendo l'analisi non valutabile.

#### Nuove metodologie di sequenziamento

Le nuove metodologie di sequenziamento definite come *next generation sequencing* (NGS) sono caratterizzate da un'enorme produttività che varia da poche giga-basi (gb) per i sequenziatori da banco, a 6.000 gb per i sequenziatori di maggiori dimensioni. Con NGS è possibile sequenziare simultaneamente milioni di differenti molecole di DNA potendo individuare in una singola analisi mutazioni, variazioni del numero di copie geniche, fusioni e espressione genica. Inoltre, la sua flessibilità consente di valutare simultaneamente pannelli di geni (da poche unità a centinaia), l'intero esoma umano (circa 30 mb), l'intero genoma (circa 3,3 gb) o l'intero trascrittoma.

La marcatura con codici a barre molecolari permette il sequenziamento contemporaneo di campioni provenienti da diversi pazienti.

L'impiego di pannelli di NGS consente una migliore interpretazione di indagini eventualmente negative per mutazioni *driver* di interesse. Infatti, l'individuazione di almeno una variante genica nella biopsia liquida rappresenta la prova della presenza di ctDNA e consente di refertare con maggiore sicurezza un risultato negativo per la mutazione di interesse.

Le due tecnologie con maggiore diffusione sono prodotte da Illumina (San Diego, CA, USA) e da ThermoFisher (Ion Torrent, Waltham, MA, USA). La prima prevede la fissazione e l'amplificazione clonale *in situ* delle molecole di DNA su sottile supporto vitreo. Nella seconda, il DNA è separato e amplificato in goccioline lipidiche e quindi distribuito in pozzetti microscopici al fondo dei quali vi è un sottile chip semiconduttore. In entrambi i casi l'insieme delle singole molecole di DNA da sequenziare è chiamato *library*. La *library* è generata da amplificazione selettiva delle regioni target con reazioni PCR

multiple oppure con la tecnologia *hybrid capture* con DNA baits (esche).

L'uso della NGS per la biopsia liquida richiede modifiche dei protocolli normalmente usati per analisi su sangue e tessuti. Il tasso di errore dell'NGS varia da 0,1 a 1% quindi, ad esempio, una mutazione con una frequenza allelica sotto tale soglia non può essere differenziata dal cosiddetto rumore di fondo. I protocolli operativi dedicati alla biopsia liquida riducono il tasso di errore. Un esempio classico di tale modifica è l'incorporamento di uno specifico identificatore molecolare prima della fase di amplificazione del DNA.

Sono state sviluppate tecniche ultrasensibili di NGS dedicate all'analisi del ctDNA. Il *Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing* (CAPP-Seq) ha come elemento caratterizzante un selettore che identifica diverse classi di mutazioni somatiche con sensibilità e specificità superiori al 90%. Risultati simili in termini di sensibilità e specificità sono stati raggiunti con le tecniche *Tagged-amplicon deep sequencing* (Tam-Seq) e *Safe-Sequencing System* (Safe-SeqS).

In conclusione, la tecnica NGS per lo studio del ctDNA per quanto sensibile e specifica, è ancora molto costosa e richiede un flusso di lavoro complesso da parte di personale altamente specializzato. L'uso in clinica di pannelli multigene su questa matrice biologica richiede, inoltre, l'uso di software sofisticati e, talora, l'ausilio di personale bioinformatico.

È quindi evidente che la scelta tra le diverse tecnologie deve tenere conto della loro sostenibilità e dell'uso clinico richiesto nel contesto in cui si opera.

## LA REFERTAZIONE

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- l'identificazione del paziente;
- l'identificazione del clinico e della struttura che ha richiesto l'analisi;
- il materiale utilizzato per l'analisi (tipologia, volume);
- il momento del prelievo (diagnosi, periodo intra/post chemioterapia o terapia biologica);
- la data del prelievo del materiale utilizzato per l'analisi;
- le modalità di conservazione del prelievo;
- la data di arrivo del campione nel laboratorio che esegue l'analisi;
- la metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi con indicazione della sensibilità e dei limiti del test;
- le mutazioni indagate;
- i risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata;
- l'interpretazione del dato e una valutazione complessiva dell'analisi con le eventuali problematiche legate al caso;

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito, datato e firmato dal responsabile del servizio.

In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare i 5 giorni lavorativi dalla richiesta della determinazione.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 2017; 545: 446-51.
- Cai X, Janku F, Zhan Q, et al. Accessing genetic information with liquid biopsies. *Trends Genet.* 2015;31:564-75.
- Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discov.* 2017 ;7:1394-403.
- El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013; 424:222-30.
- Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 2015; 7: 302ra133.
- Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, et al. Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res.* 2016;22:2386-95.
- Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:6269.
- Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36:1631-41.
- Normanno N, Denis MG, Thress KS, et al. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:12501-16.
- Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 5):v1-v27.
- Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (azd9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3375-82.
- Qiu M, Wang J, Xu Y, et al. Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24:206-12.
- Rosell R, Moran T, Queralt C et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 958-67.
- Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol* 2016;2:1014-22.
- Siravegna, G. & Bardelli, A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Mol Oncol* 2016;10:475-80.
- Ten Bosch JR, Grody WW. Keeping up with the next generation:

massively parallel sequencing in clinical diagnostics. *J Mol Diagn* 2008;10:484–92.

Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:346ra392.

Thress KS, Brant R, Carr Th, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AzD9291. *Lung Cancer* 2015;90:509-15.

Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2016;22:5772-82.

Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009;55:641–58.

Zhu G, Ye X, Dong z, Lu YC, et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2015;17:265–72.

## In ricordo di Jillian (Jill) Tate

Con rammarico e personale dolore comunichiamo alla nostra comunità scientifica che lo scorso 4 Dicembre è mancata una stimata collega e una persona di assoluto valore.

Jill Tate ci ha lasciato all'età di 68 anni dopo una lunga malattia, nonostante la quale ha portato avanti i suoi progetti con la consueta dedizione ed entusiasmo, quasi fino all'ultimo dei suoi giorni.

Jill ha lavorato per molti anni presso il Pathology Queensland Department of Chemical Pathology del Royal Brisbane and Women's Hospital di Brisbane (Australia), nell'ultimo periodo come Senior Scientist, apportando durante tutta la sua vita professionale un contributo fondamentale all'avanzamento della Medicina di Laboratorio a livello internazionale.

Durante la sua carriera ha avuto due principali campi di interesse: la diagnostica proteica e le problematiche della standardizzazione e della armonizzazione.

Per la diagnostica proteica, oltre a numerosi e fondamentali contributi sulla standardizzazione e l'utilizzo clinico della misura delle Free Light Chains nelle discrasie plasmacellulari, è necessario ricordare il suo ruolo di coordinatore dell'*Australasian Association of Clinical Biochemists' Harmonisation Committee Working Party* che ha consentito, oltre a molte altre importanti iniziative nel campo della armonizzazione in Medicina di Laboratorio, di produrre una raccomandazione sulla standardizzazione del referto della elettroforesi proteica che è stata e continua ad essere il fondamento della operatività di tutti coloro che si occupano di questo settore della diagnostica di laboratorio.

Sempre relativamente alle tematiche della standardizzazione e armonizzazione dobbiamo ricordare la sua importante attività nel campo dei marcatori di danno cardiaco (la troponina I in primis) operando come coordinatore di diversi Gruppi di lavoro di IFCC sul tema e pubblicando lavori fondamentali di riferimento.

In anni più recenti è stata prezioso Editore Associato della rivista *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (CCLM) e dal Gennaio 2018 componente dell'*International Advisory Board* di questa rivista.

Si deve a Jill la progettazione prima e la realizzazione poi del progetto dello *Special Issues* di CCLM dedicato alla armonizzazione in Medicina di Laboratorio: *Harmonization in Laboratory Medicine: the Request, the Sample, the Measurement, and the Report*. Sfortunatamente ha potuto vedere pubblicata solo la prima parte di questo importante progetto, che è stato portato avanti e concluso grazie al suo lavoro ed entusiasmo.

Il tributo più importante che possiamo dedicare a Jill è tuttavia l'apprezzamento e il riconoscimento delle sue qualità umane: il suo approccio gentile e rispettoso alle persone, la sua sensibilità e disponibilità all'ascolto delle opinioni degli altri.

La ricordiamo perciò qui con rispetto e ammirazione sia ai Colleghi che hanno avuto l'onore e il piacere di conoscerla e lavorare con lei, sia ai molti che l'hanno apprezzata attraverso i suoi articoli e la sua attività scientifica che rimangono di assoluto riferimento culturale e professionale per molti di noi.

Maria Stella Graziani  
Mario Plebani



## Jill Tate: Mentoring as a life legacy

Jillian Russyll Tate died on December 4, 2018, aged 68 years old. When I heard the news, I was saddened and thought the laboratory medicine community lost an important icon of harmonization and standardization of laboratory tests, a task so difficult that many of us shy away from such a herculean effort. Jill Tate was a senior scientist at the Pathology Queensland Department of Chemical Pathology at the Royal Brisbane and Women's Hospital in Brisbane, Australia. Jill has close to 100 peer-reviewed publications available on PubMed. She was a member of the editorial board of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) journal and an active member of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) working groups on standardization of reporting assays such as the cardiac troponin, lipoprotein(a) and protein electrophoresis. She was chair of the Australasian Association of Clinical Biochemists' Harmonization Committee, working on a range of harmonization activities including common reference intervals, standardized units, terminology and reporting in pathology, and critical laboratory results.

The first time I heard about Jill Tate, it was from a world famous colleague who said Jill was the first person to speak up and publish on the analytical interferences and challenges with free light chain measurement by nephelometry. Jill published a series of articles raising important findings that overall raised awareness of analytical issues and improved the assay, today used to diagnose and monitor monoclonal gammopathies [1-4]. This must have taken courage. She did that on her own, at a time when no one else from large institutions had done similar experiments or challenged the new assay.

I knew one of Jill Tate's many academic interests and that is the passion we shared. A mentor at Mayo Clinic introduced us when we wrote a review for a special issue on CCLM. I first met Jill in Philadelphia at an annual meeting of the American Association for Clinical Chemistry (AACC), in August of 2016. Such a kind, smiling lady was in front of me. We had been corresponding via email for a little over a year before we met in person. We went on a walk to a restaurant to have brunch. The restaurant was full and we waited in line for almost an hour until we had a table. We chatted about chemistry in the States, about the Theranos phenomenon and how speaking up about it was perceived, about monoclonal gammopathies current and future states. At the time, we were planning a survey to be submitted to all IFCC laboratories on reporting practices of serum protein electrophoresis, immunofixation and other assays used to diagnose and monitor monoclonal gammopathies. I came back from that meeting with Jill very energized and confident that we were on a mission, and that harmonizing practices to report these assays would be beneficial to physicians, laboratorians and patients worldwide. I was eager to contribute and Jill's enthusiasm on making a difference was contagious.

The survey was submitted to all IFCC laboratories, and when we met for a second time in person, almost a year later in Athens, at Euromedlab in June 2017, it was to analyze the data from the survey results. The questions we had asked made us think of new questions and new challenges to address. We realized the practices vary widely in each country and different sizes of healthcare systems. We concluded that a universal recommendation for reporting a diverse group of tests used for diagnosis and monitoring of a range of pre-malignant and malignant conditions was... simply not possible - when systems unique realities related to technology costs, information delivery to both clinicians and patients and ease of use of such recommendations <http://www.ifcc.org/ifcc-education-division/working-groups-special-projects/wg-icqa/>. I suspect Jill knew from the beginning the size of such a task. I am not sure I did. Jill encouraged me to pursue a specific doubt which arose from that survey, related to the limit of quantitation for monoclonal proteins detected on protein electrophoresis. Although not originally related to reporting, it was somewhat evident that labs had different limits of quantitation for monoclonal proteins, which can impact the follow-up of patients being seen in multiple institutions. This study is still in progress, and perhaps, recognizing differences between methods and institutions may be a path to future standardization.

Jill was a very articulate writer. She was an effective communicator via email. I was impressed by her skills in leading diverse working groups, capacity for decision-making, sound understanding of the issues raised by the group, encouragement and follow-up. Jill lived in Australia, and interacted with peers from Italy, Canada, Germany and the US routinely. Despite the time difference and geographical distance, she was usually the first person to respond to an email from her teammates with guidance. These are not easy responsibilities to accomplish by email. They require servant leadership skills.

Jill was able to put her thoughts and opinions in words and translate them into actions, while taking the groups' directives in mind and without sounding authoritarian, but still setting the tone. She would sound excited and appreciative, and as a member of one of her working groups, I felt safe, since the beginning of times, to express my opinions very candidly to her, and I received the same treatment back with her sincere opinions, unpretentious comments, and the most important of all constructive criticism whenever necessary. That type of wisdom, kindness and genuine mentoring are very hard to come by in the life of a young professional these days.

I met Jill Tate in person only a couple of times in my life, and yet I can truly say that the impact she has had in my career was tremendous. She opened many doors for me, by trusting my input and opinions, being generous with

her support and listening. She welcomed me to her working group and gave me space and time so that my voice was heard. She believed I could do it, something I sometimes still wonder about. She was one of the most humble, enthusiastic and kind people I have met in the field of laboratory medicine, and I'll always be grateful for having had her as a mentor and colleague. She was a living example of the professional I would like to become one day. She always inspired me to go the extra-mile and to pursue the improvements and challenges of our profession that were dear to my heart. In her last email to me, when she already knew she was sick and unable to keep going with her work-related activities, she said "life must go on for people like you. They say, enjoy every day." A simple, humble message, no Hollywood ending to life. I know I am only one of the innumerable people that she mentored throughout her career and that she touched many lives. I hope that we can cherish her memory by passing on what we learned from her, what she inspired us to be. Every day counts, and every day can make a difference. She sparked the fire within me to indeed enjoy life, find purpose in the work I do, and with that help others find their voice and carry on her mentoring legacy.

Maria Alice Vieira Willrich

Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA  
Rochester MN 55905 | Willrich.mariaalice@mayo.edu

#### References

1. Jacobs JF, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1021-30.
2. Kennard A, Hawley C, Tate J, Klingberg S, Pretorius C, Hutchison C, et al. Comparison of Freelite and N Latex serum free light chain assays in subjects with end stage kidney disease on haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1045-52.
3. Marshall G, Tate J, Mollee P. Borderline high serum free light chain kappa/lambda ratios are seen not only in dialysis patients but also in non-dialysis-dependent renal impairment and inflammatory states. *Am J Clin Pathol* 2009;132:309.
4. Tate J, Bazeley S, Sykes S, Mollee P. Quantitative serum free light chain assay--analytical issues. *Clin Biochem Rev* 2009;30:131-40.

