
BC

biochimica clinica

In questo numero:

LE DISCRASIE PLASMACELLULARI

**GAMMOPATIE MONOCLONALI:
QUADRI CLINICI PRINCIPALI E RUOLO DEL LABORATORIO**
vedi pag. 366

GAMMOPATIE MONOCLONALI DI SIGNIFICATO CLINICO
vedi pag. 421



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

4

EDITORIALE

355

Le gammopatie monoclonali: una sfida continua per la Medicina di Laboratorio
G. Merlini

RASSEGNE

357

Identificazione di geni di normalizzazione per studi trascrizionali con Polymerase Chain Reaction

A. Nevone, P. Cascino, M. Bozzola, G. Palladini, M. Nuvolone

366

Gammopatie monoclonali: quadri clinici principali e ruolo del laboratorio
F. Adami, T. Berno, M. Riva, F. Lessi, M. S. Graziani

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

384

Variabilità biologica dei parametri dell'esame emocromocitometrico in soggetti sani
M. Seghezzi, S. Buoro, B. Manenti, P. Dominoni, F. Ceriotti, C. Ottomano, G. Lippi, A. Carobene

394

Evaluation of a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from culture colonies
A. Bartolini, M. Scapatucci, M. Zoppelletto, G. Da Rin

399

Comparative study of galectin-3, brain natriuretic peptide, cystatine C and high sensitivity troponin determinations in the diagnosis of heart failure in elderly italian males

V. Sara, G. Gianluca, G. Elisabetta, V. Letizia, G. Francesca, M. Iacoviello

406

Studio preliminare del microbiota intestinale, cutaneo e della mucosa orale in pazienti affetti da Pemfigo Volgare e Pemfigoide Bolloso

E. De Paolis, G. L. Scaglione, M. De Bonis, L. Fania, F. Mignone, E. Capoluongo

OPINIONI

413

La metilazione del DNA nella diagnostica: stato dell'arte e prospettive
A. Fuso, M. Lucarelli

421

Gammopatie monoclonali di significato clinico
F. Adami

DOCUMENTI

424

La Medicina di Laboratorio: gli specialisti di domani
G. Sancesario, M. Alfonso Perrone, C. Pellegrini, C. Ialongo, A. Aita, P. K. Dabla, S. F. Taie, J. Favresse, A. Velts-Lindh, V. D'Argenio, M. Ammirabile, F. Spolaore, C. Renzi, M. Nuvolone, F. Cariati, C. Bellini, M. Benati, G. L. Salvagno, M. Plebani, S. Bernardini

435

Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare
F. Di Maggio, F. Borrillo, F. Cariati, R. Tomaiuolo, V. D'Argenio

DOCUMENTI SIBioC

449

Documento di consenso Gruppo di Studio di Farmacotossicologia Clinica e Doping SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI). Modalità per lo svolgimento di indagini di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso
D. Favretto, S. Pichini, P. Bucchioni, R. Pacifici

sommario

CASI CLINICI

e35

Una paziente con dolori ossei diffusi: il ruolo del laboratorio nel diagnosticarne la causa

D. Debbia, P. Natali, L. Ferrara, M. Varani, G. Longo, T. Trenti

e38

Un caso clinico di linfocitosi persistente

B. Jance, B. Salvadori, F. Cesari, A. Rogolino, B. Peruzzi, R. Caporale, A. Fanelli

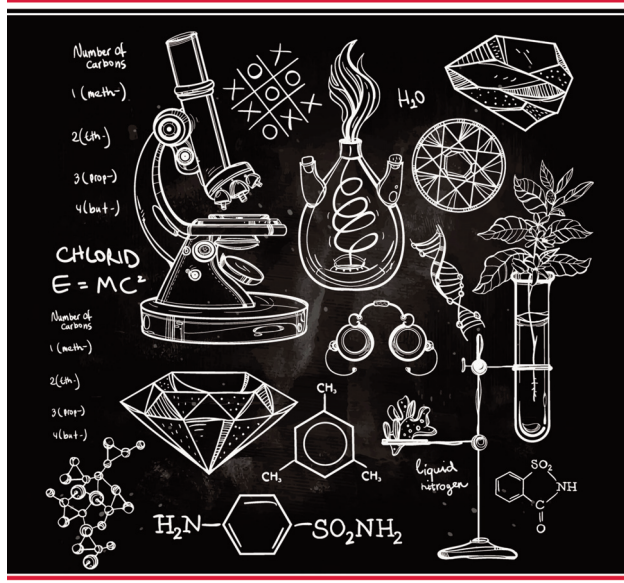
riservato ai lettori di Biochimica Clinica

**Buono
sconto**

20%
sul prezzo di copertina!

€ 20,00

€ 25,00
Medicina di Laboratorio
SubBioC
BC
biochimica clinica
**CASI CLINICI
IN MEDICINA
DI LABORATORIO**
A cura di
MARIA STELLA GRAZIANI e MAURO PANTEGHINI



€ 40,00

€ 50,00
NOVA
RISTAMPA
BB
Biomedica Source Books

20
**Quiz, Quesiti e Casi clinici
di Medicina di Laboratorio**
A cura di
Piero Bonvicini (1945-2005),
Michele Bellenzier, Antonio Croce, Arianna De Pellegrin,
Bruno Forcina, Nunzio Toffano, Carlo Zambon
Presentazione di
Mario Plebani
BIO MEDIA
La collana di Biologia

...e molto altro ancora

utilizzando il codice sconto **BC-2019**
sul sito biomedishop.net

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

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

membro di

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

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

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Deputy Director

Martina Zaninotto

Associate Editors

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

International Advisory Board

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

Editorial Secretary

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

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

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

SIBioC Executive Board 2018-2019

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

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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



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

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

Volume 43

Numero 4 - Dicembre 2019

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.

Le gammopatie monoclonali: una sfida continua per la Medicina di Laboratorio

Giampaolo Merlini

Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Pavia

Come ben noto, il laboratorio ha un ruolo fondamentale nella gestione delle gammopatie monoclonali, dalla diagnosi, alla definizione della prognosi, alla scelta della terapia e al suo monitoraggio. Da sempre i professionisti di laboratorio sono impegnati nello sviluppo di metodiche e tecnologie per offrire nuovi e migliori strumenti per la gestione di questi pazienti al fine di assicurare loro in miglior *outcome* (1). Il Gruppo di Studio "Proteine" di SIBioC ha prodotto negli anni diversi documenti, linee-guida e raccomandazioni relativi alle metodiche e alle procedure da seguire nel laboratorio clinico (2-6). In questo numero di *Biochimica Clinica* vengono pubblicati due eccellenti lavori di aggiornamento (7,8) che affrontano soprattutto gli aspetti clinici più che quelli di laboratorio di queste interessanti patologie, nell'intento di fornire nuove, approfondite e sistematiche informazioni ai professionisti di laboratorio che svolgono un ruolo fondamentale nella diagnostica e nel monitoraggio dell'efficacia della terapia di queste patologie. Il ruolo del laboratorio nella gestione del paziente con discrasia plasmacellulare viene infatti sempre richiamato e ben descritto nei due lavori pubblicati.

La rassegna "Gammopatie monoclonali: quadri clinici principali e ruolo del laboratorio" a cura di Adami et al. (7) esamina i principali quadri clinici correlati alle gammopatie monoclonali, illustrandone i diversi aspetti (eziologia, diagnosi, prognosi, terapia). Per ogni quadro clinico esaminato viene poi evidenziato il sostanziale contributo del laboratorio nei diversi contesti clinici, sottolineando come le manifestazioni estremamente pleomorfe di queste condizioni richiedano una costante collaborazione tra clinico e laboratorista per una corretta gestione del paziente.

L'opinione "Gammopatie monoclonali di significato clinico", a cura dello stesso Autore (8), commenta una rassegna pubblicata su *Blood* lo scorso anno (9) su alcune entità cliniche causate da cloni plasmacellulari o B-linfocitari secernenti, solitamente di piccole dimensioni, descrivendo i sottostanti meccanismi patogenetici (già chiariti o anche solo ipotizzati). Gli Autori della rassegna originale hanno coniato per queste patologie il termine di "Gammopatie monoclonali di significato clinico", che sottolinea l'ampliarsi e il definirsi del campo nel quale il danno biologico si verifica non tanto per la proliferazione delle cellule del clone ma a causa di proprietà biologiche del clone e/o della immunoglobulina monoclonale secreta, che quindi non viene più considerata solo un marcatore di malattia ma causa essa stessa di malattia. Anche in questo caso viene richiamata l'attenzione sul ruolo del laboratorio e sulla necessità che le attività del laboratorio siano indirizzate dal sospetto clinico per poter garantire la migliore gestione del paziente.

E' sempre necessario che il laboratorista mantenga uno sguardo attento ai rapidi sviluppi della clinica per anticiparne le esigenze emergenti e partecipare da attore al miglioramento delle cure. Ad esempio, nell'ultimo decennio, diversi farmaci altamente efficaci sono stati approvati per il trattamento del mieloma multiplo. In particolare, l'introduzione di terapie basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali ha portato un significativo miglioramento dell'*outcome* (10,11), ma allo stesso tempo, ha posto una nuova sfida al laboratorio per la messa a punto di nuove tecnologie. Un anticorpo monoclonale entrato ora nella pratica clinica è una IgG1-k anti-CD38 che può raggiungere nel siero concentrazioni di 1 g/L ponendo problemi di identificazione e quantificazione della proteina monoclonale endogena. Per il monitoraggio ottimale della proteina monoclonale il professionista di laboratorio deve quindi dialogare con il clinico, per essere informato dell'uso di questo farmaco e, d'altra parte, il laboratorista deve essere a conoscenza che la comparsa di una piccola banda monoclonale in regione gamma può essere associata all'uso dell'anticorpo monoclonale. Per risolvere questa interferenza è stato sviluppato un test specifico (DIRA) (12), ma altri anticorpi monoclonali sono entrati nella pratica clinica e il laboratorista deve utilizzare la sua conoscenza ed esperienza per identificare e risolvere queste nuove interferenze.

Inoltre, utilizzando i nuovi farmaci nella moderna terapia di combinazione in pazienti con mieloma multiplo e malattie correlate di nuova diagnosi, in una significativa proporzione di pazienti si raggiunge una negatività della malattia minima residua (MRD), ora definita come l'assenza di una plasmacellula neoplastica su 10^5 - 10^6 cellule

Corrispondenza a: Giampaolo Merlini, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Pavia, E-mail gmerlini@unipv.it

Ricevuto: 13.11.2019

Revisionato: 14.11.2019

Accettato: 15.11.2019

Pubblicato on-line: 26.11.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.077

midollari. I test per definire la MRD sono rapidamente diventati parte integrante delle sperimentazioni cliniche perché la negatività della MRD è strettamente correlata alla sopravvivenza libera da progressione della malattia, come documentato in una meta-analisi (13). La negatività della MRD potrà diventare presto un *end point* surrogato per l'approvazione dei farmaci, ma sta entrando anche nella pratica clinica come obiettivo del trattamento (14). Gli esami su siero e urine attualmente disponibili, anche utilizzando la spettrometria di massa, non sono in grado di rilevare la immunoglobulina monoclonale prodotta da 10^6 - 10^8 cellule neoplastiche. I metodi attualmente raccomandati sono *next generation sequencing* o *next generation flow* (15,16) tecnologie già implementate in molti laboratori clinici per soddisfare le emergenti necessità della medicina clinica.

Come bene esemplificato nei due lavori pubblicati in questo numero di *Biochimica Clinica*, il dialogo paritetico fra medicina clinica e medicina di laboratorio genera continuamente occasioni di ricerca e sviluppo orientate al miglioramento della salute. Certamente questo richiede uno sforzo culturale faticoso, soprattutto da parte dei molti Colleghi operati dalla routine e dalla burocrazia, ma, come spesso richiamato da illustri esponenti della nostra Società, ineludibile.

BIBLIOGRAFIA

1. Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:907-19.
2. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2001;25:23-32.
3. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:338-46.
4. Graziani M, Dolci A, Greco C, et al. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi proteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
5. Dolci A, Vernocchi A. Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-9.
6. Caldini A, Graziani M, Basile U, et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
7. Adami F, Berno T, Riva M et al. Gammopatie monoclonali: quadri clinici principali e ruolo del laboratorio. *Biochim Clin* 2019;43:366-83.
8. Adami F. Gammopatie monoclonali di significato clinico. *Biochim Clin* 2019;43:421-5.
9. Fermand JP, Bridoux F, Dispenzieri A et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications. *Blood* 2018;132:1478-185.
10. Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for untreated myeloma. *N Engl J Med* 2018;378: 518-28.
11. Facon T, Kumar S, Plesner T et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med* 2019;380:2104-15.
12. McCudden C, Axel AE, Slaets D et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1095-104.
13. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC et al. Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017;3:28-35.
14. Housseau JL, Avet-Loiseau H. Minimal Residual Disease negativity is a new end point of myeloma therapy. *J Clin Oncol* 2017;35:2863-5.
15. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2018;132:2456-64.
16. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017;31:2094-103.

Identificazione di geni di normalizzazione per studi trascrizionali con Polymerase Chain Reaction

Alice Nevone¹, Pasquale Cascino¹, Margherita Bozzola¹, Giovanni Palladini¹, Mario Nuvolone¹

¹Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Laboratorio di Biochimica Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

ABSTRACT

Identification of genes for normalization of RT-qPCR gene expression data: a review of published literature.

Reverse-transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) is a well-established technique to quantify gene expression levels and critically depends on reference genes for data normalization.

We performed a review of biomedical literature to analyse the usage of RT-qPCR in relation to other techniques for transcriptional analyses and to describe practices for the identification of suitable reference genes for RT-qPCR.

In the 81 analysed studies, 3 genes (*GAPD*, *ACTB*, *B2M*) were included in $\geq 70\%$ of cases, but ranked among the most stable genes in $\leq 1/3$ of cases. The most frequently used normalizing algorithm was *geNorm* (83%), followed by *NormFinder* (73%) and *BestKeeper* (32%).

We also analysed transparency and good laboratory practices based on adherence to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines, using selected validated evaluation criteria. Overall, key MIQE criteria were satisfied in $\geq 50\%$ of analyzed studies, but only four criteria (details of employed kit/enzyme for reverse transcription, priming method, primers/probes and DNA polymerase) were satisfied in $\geq 90\%$ of cases. Data on assay repeatability were reported only in 15% of studies. The presence of pseudogenes as a potential confounder of assay specificity was evaluated only in 13% of studies. Finally, as few as 6% of studies accounted for the presence of known mutations of singly nucleotide polymorphisms when designing assay primers/probes.

Better adherence to the MIQE guidelines should be encouraged. Publicly available transcriptomic and genomic data sets could be employed to refine the identification of suitable normalizing genes and to assist assay design.

INTRODUZIONE

La reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR) è il metodo più comunemente usato per rilevare e quantificare gli acidi nucleici (1). Questa metodica consiste nel monitoraggio in tempo reale della produzione di uno specifico amplicone della PCR a partire da una molecola template di DNA, sfruttando un segnale di fluorescenza (2). La qPCR a trascrizione inversa (RT-qPCR, dall'inglese *reverse transcription qPCR*) consente la rilevazione e quantificazione dell'RNA, in seguito alla sua trascrizione inversa in DNA complementare (cDNA) (3).

Grazie alla sua sensibilità, accuratezza, riproducibilità, ampio range dinamico, nonché alla sua facilità d'uso, versatilità e ai costi limitati, la RT-qPCR è il metodo di

elezione per l'analisi dei livelli di espressione di un numero limitato di geni (4, 5) e per diverse applicazioni di diagnostica molecolare (6-10).

L'attendibilità della quantificazione dei livelli di RNA attraverso RT-qPCR dipende in modo cruciale da un numero di variabili pre-analitiche e analitiche, tra cui figurano l'estrazione dell'RNA e la contestuale rimozione del DNA genomico (gDNA), la trascrizione inversa e l'amplificazione del cDNA durante la fase di PCR (4, 11). Pertanto, risulta essenziale l'impiego di una procedura idonea per la normalizzazione dei dati di espressione genica che consenta di correggere per queste variabili e garantire così una quantificazione accurata.

Sebbene negli anni siano stati proposti diversi approcci per la normalizzazione dei dati di RT-qPCR [descritti

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

Ricevuto: 01.03.2019

Revisionato: 20.05.2019

Accettato: 23.05.2019

Publicato on-line: 05.09.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.051

approfonditamente da Huggett et al. (4)], il metodo maggiormente entrato nell'uso si basa sull'uso dei cosiddetti geni di riferimento usati come controlli interni (4, 11).

Questo approccio consiste nel normalizzare i livelli di espressione di uno o più geni di interesse con i livelli di espressione di uno o più geni di riferimento, detti anche geni normalizzanti e spesso indicati nella letteratura anglosassone come geni *housekeeping* (4, 11). Poiché i livelli dei geni di riferimento sono misurati tramite RT-qPCR nei campioni sperimentali parallelamente ai livelli dei geni di interesse e sono quindi soggetti alle stesse variabili, la quantificazione che ne consegue risulta accurata (4, 11).

Tale metodo di normalizzazione necessita che il gene di riferimento impiegato sia stabilmente espresso nella condizione sperimentale in esame e il livello di mRNA mostri una forte correlazione con l'mRNA totale presente nel campione (4, 11).

I geni di riferimento più comunemente utilizzati per la normalizzazione dei dati di RT-qPCR sono *ACTB*, *GAPD*, *RNA18S*, *B2M* e *HPRT* (4, 12).

Come osservato in precedenza, la polarità di questi specifici geni risale al loro precedente impiego come geni di riferimento nel contesto di analisi con *Northern blotting*, saggi di protezione dalla RNasi e per la convenzionale PCR a trascrizione inversa, grazie al loro livello di espressione relativamente alto in tutte le cellule, che li ha resi i controlli ideali per saggi semi-quantitativi (4).

Tuttavia, già nell'era precedente la RT-qPCR, numerosi lavori avevano descritto condizioni fisiologiche o patologiche in cui i livelli di mRNA di questi classici geni di riferimento mostravano una variazione significativa (13-15). L'avvento della RT-qPCR, con la sua potenzialità di quantificare accuratamente i livelli di espressione genica, non è stato accompagnato da una valutazione dell'idoneità di questi geni di riferimento per questo nuovo scopo, e così questi classici geni di riferimento sono stati semplicemente adottati nella maggior parte degli studi come retaggio storico (4). In effetti, numerosi studi di RT-qPCR hanno ulteriormente confermato che l'espressione di questi classici geni di riferimento può variare in modo sostanziale in diversi contesti sperimentali, in cui si sono quindi rivelati ampiamente inadeguati come geni normalizzatori (16-24).

Un'analisi bioinformatica condotta da Sun et al. ha inoltre sollevato il possibile effetto deleterio dell'esistenza di pseudogeni correlati ai geni impiegati per la normalizzazione (25). In particolare, questi Autori hanno mostrato il caso emblematico di *ACTB* e *GAPDH* umani e dei loro ortologi murini *Actb* e *Gapdh*, i quali mostrano rispettivamente 64, 67, 69 e 197 pseudogeni nei genomi corrispondenti (25).

Dal momento che gli pseudogeni sono elementi privi di introni, di dimensioni simili all'autentico mRNA e altamente omologhi ai corrispondenti geni, l'amplificazione del cDNA degli pseudogeni trascritti o

del gDNA potenzialmente residuo non può essere evitata con l'utilizzo della maggior parte delle coppie di primer, risultando in una normalizzazione non attendibile (25). Non a caso, la scelta di geni di riferimento inappropriati può portare a conclusioni sperimentali errate (4, 20, 23, 26, 27), che occasionalmente hanno comportato la ritrattazione di alcune pubblicazioni (28-31). In effetti, la scelta di geni di riferimento adeguati per la normalizzazione è attualmente considerata una delle fasi più critiche negli esperimenti RT-qPCR (4, 5, 11, 32). Proprio per questa ragione, nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi sistemi che facilitano l'identificazione dei geni di riferimento più stabili nei contesti di studio analizzati.

Nel loro pionieristico lavoro pubblicato nel 2002, Vandesompele et al. hanno sviluppato un algoritmo in grado di verificare sperimentalmente la stabilità dell'espressione di un gruppo di geni candidati per la normalizzazione in un dato insieme di campioni, in modo da consentire l'impiego di geni validati per la normalizzazione. Questo algoritmo, chiamato *geNorm*, analizza i livelli di espressione non normalizzati ottenuti sperimentalmente in un determinato insieme di campioni e determina una graduatoria di stabilità dei geni presi in esame, mostrando inoltre l'eventuale vantaggio di utilizzare più di un gene di riferimento per la normalizzazione (33).

Seguendo il percorso indicato da Vandesompele, una serie di altre strategie computazionali e algoritmi di normalizzazione sono stati introdotti poco dopo, tra cui *BestKeeper* (34), *NormFinder* (35) e il metodo Δ -Ct comparativo (36). Data la loro facilità di impiego, grazie anche all'esistenza di strumenti online che ne facilitano l'utilizzo simultaneo come *RefFinder*, è frequente il ricorso a più sistemi di normalizzazione in uno stesso contesto sperimentale, per quanto, in caso di discordanza dei risultati ottenuti tra i vari sistemi, non esiste comunanza di pensiero su quali geni di normalizzazione impiegare (37).

La necessità di una validazione sistematica dei geni di riferimento per un determinato contesto sperimentale e l'uso di geni pre-validati per la normalizzazione con algoritmi adeguati sono alcuni dei parametri riconosciuti come essenziali dalle linee guida MIQE (acronimo di *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*, informazioni minime per la pubblicazione di esperimenti di RT-qPCR) (1, 4, 11, 32). Pubblicate nel 2009 da Bustin et al., le raccomandazioni esposte in queste linee guida hanno ricevuto ampia visibilità, benché siano state spesso disattese (1, 11, 38). Ad esempio, nel 2014 Dijkstra et al. hanno eseguito una revisione sistematica di tutte le pubblicazioni scientifiche che hanno utilizzato RT-qPCR per studi relativi al carcinoma del colon-retto tra gennaio 2009 e agosto 2013. Nel 92% dei 179 studi analizzati è stato utilizzato un solo gene di riferimento, con *ACTB*, *GAPD* (o *GAPDH*), *RNA18S* (o *18S*), *B2M* e *HPRT* (o *HPRT1*) tra i geni più frequentemente impiegati (12). Inoltre, in un'indagine svolta su oltre 1700 lavori che includevano

analisi di RT-qPCR pubblicati tra il 2009 e il 2013, gli articoli che citavano le linee guida MIQE continuavano ad essere un numero notevolmente limitato e nella maggior parte di questi lavori i geni di riferimento sono stati impiegati senza un'adeguata validazione sperimentale (5). Nel loro complesso, queste osservazioni indicano che l'esistenza delle linee guida MIQE è necessaria, ma non sufficiente al radicarsi di questi accorgimenti nella pratica corrente (1, 12, 39).

Alla luce dell'importanza di individuare geni idonei per la normalizzazione dei dati di RT-qPCR, in anni recenti sono stati condotti numerosi studi volti ad indagare geni candidati alla normalizzazione in specifici contesti sperimentali. In virtù del potenziale impatto di questo tipo di studi, che potrebbero indirizzare l'impiego di specifici geni e specifici saggi di PCR per un particolare settore di studi, è auspicabile che il disegno sperimentale di questi studi e la tipologia di informazioni riportate nelle relative pubblicazioni siano conformi a quanto previsto dalle linee guida MIQE, in modo da garantire l'interpretabilità e la riproducibilità dei dati.

Tuttavia, ad oggi manca una panoramica delle pratiche di ricerca di geni di normalizzazione per RT-qPCR. Nel presente lavoro ci proponiamo di effettuare una revisione della letteratura pertinente, valutandone gli aspetti sperimentali e l'adesione alle linee guida MIQE.

METODI

Analisi della distribuzione temporale di pubblicazioni relative a metodiche per studi trascrizionali

Abbiamo effettuato una ricerca della letteratura scientifica fino al Dicembre 2018, volta ad analizzare la distribuzione temporale delle pubblicazioni relative ad alcune metodiche per studi trascrizionali. A tale scopo, sono state effettuate ricerche PubMed mediante l'uso delle seguenti parole chiave: "Northern blotting" OR "Northern blot"; "RT-qPCR" OR "RT-PCR" OR "qPCR" OR "quantitative PCR" OR "Real time PCR"; "microarray" OR "gene expression microarray"; "RNAseq" OR "RNA-seq" OR "RNA sequencing".

Revisione sistematica di lavori scientifici per la validazione di geni di normalizzazione per studi di RT-qPCR

E' stata raccolta la letteratura scientifica sull'identificazione di geni di riferimento candidati per la normalizzazione dei dati qPCR nel contesto degli studi umani presente su PubMed al Giugno 2018. A tale scopo, è stata usata una combinazione di ciascuna delle parole chiave "Reference genes", "normalization genes" o "normalization", con ciascuna delle parole chiave "RT-PCR", "qPCR", "real time PCR", "real time qPCR", "quantitative PCR". Sono stati applicati i seguenti filtri PubMed: Species – Human; Field - Title. Questa ricerca ha portato a un totale di 101 studi.

Sono stati analizzati gli abstract di tutti gli studi

raccolti e sono stati esclusi gli studi non inerenti (20 studi). I restanti 81 studi corrispondenti all'oggetto di interesse sono stati analizzati per estrapolare le seguenti informazioni: condizione sperimentale di studio, geni candidati testati, approccio normalizzante, geni di riferimento risultati più stabili. La lista degli 81 studi analizzati in questa revisione è disponibile come materiale supplementare (S1).

Aderenza alle linee guida MIQE

L'aderenza alle linee guida MIQE negli 81 lavori inclusi nell'analisi è stata valutata da un operatore, seguendo la metodologia indicata da Bustin et al (5). In particolare, sono stati presi in considerazione i seguenti 12 parametri inclusi nelle linee guida MIQE e rilevanti per il tipo di studi in esame:

- integrità dell'RNA;
- purezza dell'RNA;
- quantità di RNA per la retrotrascrizione;
- enzima o il kit per la retrotrascrizione;
- metodo per il priming della retrotrascrizione;
- sequenze e dettagli dei primer e delle sonde;
- dettagli della DNA polimerasi o del kit per PCR impiegati;
- quantità di templatolo di DNA per la reazione di PCR;
- concentrazione finale dei primer e delle sonde usate;
- dettagli su temperature e cicli della PCR;
- dati sull'efficienza della PCR;
- specificità del saggio.

In aggiunta è stato valutato se la ripetibilità del saggio (variazione intra- e inter-assay) sia stata verificata. E' stato inoltre indagato se, nella scelta dei geni in esame, sia stata presa in considerazione l'esistenza di pseudogeni. Infine, si è valutato se, nel disegno dei primer, siano stati presi in considerazione mutazioni o polimorfismi genomici quali possibili fonti di non corrispondenza tra la sequenza del primer e la sequenza del cDNA bersaglio.

Al momento dell'analisi, i lavori sono stati dicotomizzati in base alla data di pubblicazione, antecedente o successiva alla pubblicazione delle linee guida MIQE. Inoltre, similmente a quanto effettuato da Bustin et al. (5), gli articoli pubblicati dopo il 2009 sono stati ulteriormente dicotomizzati in base alla presenza o meno di un riferimento diretto alle linee guida MIQE.

Valutazione della presenza di possibili fonti di mismatch di sequenza nei primer

È stata effettuata una subanalisi della letteratura precedentemente inclusa nell'analisi, selezionando in modo casuale un campione di 15 geni tra i geni risultati maggiormente stabili in almeno uno studio. Le sequenze delle coppie di primer di questi geni sono state analizzate in Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) e dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) per la presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) noti nelle corrispondenti regioni genomiche.

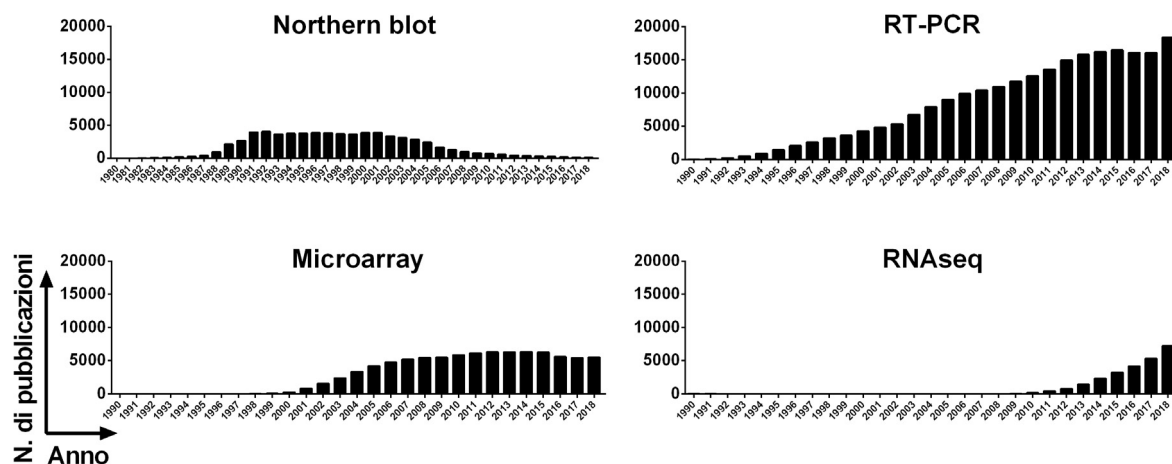


Figura 1
 Impiego di tecniche per studi trascrizionali nella letteratura biomedica. Istogramma dell'andamento annuale di impiego di tecniche per studi trascrizionali. I grafici mostrano il numero di pubblicazioni per anno di 4 tecniche per studi trascrizionali. I dati sono stati ottenuti da Pubmed, usando una serie di parole chiave come riportato nella sezione "Materiali e Metodi".

RISULTATI

I risultati relativi alla frequenza di utilizzo nel corso degli anni delle diverse metodiche per studi trascrizionali, dimostrano come il numero di nuove pubblicazioni relative a *Northern blotting* è in progressivo declino dal 2001, mentre le pubblicazioni relative a *Microarray* hanno raggiunto un picco di 6 332 nell'anno 2014 e negli ultimi 3 anni si assestano in media a 5 525 pubblicazioni annue (Figura 1). Le pubblicazioni relative a *RNA Sequencing* mostrano un andamento in progressivo aumento, con circa 7 200 pubblicazioni del 2018 (Figura 1). La RT-qPCR permane la metodica per studi trascrizionali più diffusa, mostrando nel complesso un incremento progressivo nel tempo, con un picco di citazioni pari a 18 349 nel 2018 (Figura 1). Si esclude la possibilità che tali valori di diffusione dell'RT-qPCR possano dipendere dall'inclusione, mediante la nostra ricerca, di studi che impieghino genericamente la PCR, anche al di fuori di studi propriamente trascrizionali, alla luce degli stringenti criteri di ricerca. In linea con questa osservazione, si segnala che il numero di pubblicazioni relative a "PCR" o "polymerase chain reaction" nel solo 2018 era pari a 37 970. Tali osservazioni confermano il continuo e ampio impiego di RT-qPCR per studi trascrizionali.

La ricerca relativa ai geni per la normalizzazione dei dati di espressione di qPCR ha consentito di identificare 81 studi, pubblicati tra il 2001 e il 2018 (con circa il 59% dei lavori pubblicati dal 2012 al 2018) su 50 diverse riviste con impact factor compreso tra 0,8 e 9,38. Questi studi prendevano in esame diverse condizioni fisiologiche o patologiche e diversi tipologie di cellule o tessuti. Nel contesto di questi 81 studi, erano stati

indagati 133 geni unici.

Tra i geni candidati per la normalizzazione che sono stati analizzati, 5 geni sono tanto predominanti da esser stati inclusi in più del 50% degli studi pubblicati, con *GAPD* presente nell'89% degli studi, *ACTB* nel 75%, *B2M* nel 73%, *HPRT* nel 64% e *TBP* nel 58% (Figura 2).

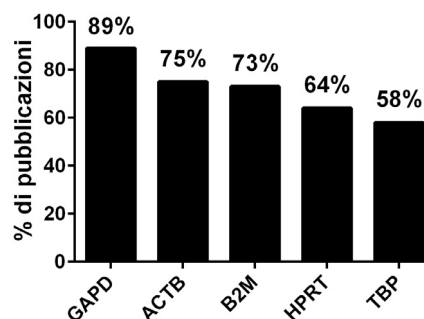


Figura 2
 Istogramma della frequenza relativa ai 5 geni più investigati come possibili geni di normalizzazione tra gli 81 studi presi in esame.

Soltanto due articoli non presentavano nessuno di questi 5 geni tra quelli presi in esame come candidati normalizzanti. Benché *GAPD*, *ACTB* e *B2M* siano indagati in più del 70% degli studi, solo in circa uno studio su tre questi geni sono risultati nella rosa dei geni più stabili (Tabella 1). Viceversa, geni indagati meno frequentemente di questi sono, in percentuale, risultati più spesso nella rosa dei geni più stabili, tra cui *RPLP0* e *PUM1* (trascorrendo geni presi in esame in uno o pochi studi) (Tabella 1).

Tabella 1

Lista dei 62 geni stabilmente espressi nella letteratura esaminata.

I 62 geni risultati nella rosa dei geni più stabili negli articoli ottenuti dalla revisione della letteratura sono qui ordinati per ricorrenza. Di ciascuno è riportata la frequenza e percentuale in cui sono stati studiati negli 81 articoli ("Gene indagato") e la frequenza e percentuale in cui sono risultati nella rosa dei geni più stabili tra gli articoli in cui sono stati testati ("Gene stabile").

Nome	Gene indagato		Gene stabile		Nome	Gene indagato		Gene stabile	
GAPD	72/81	88,89%	24/72	33,33%	ALAS1	5/81	6,17%	2/5	40,00%
ACTB	61/81	75,31%	19/61	31,14%	CYC1	5/81	6,17%	2/5	40,00%
B2M	59/81	72,84%	11/59	18,64%	MTATP6	4/81	4,94%	2/4	50,00%
HPRT1	52/81	64,20%	18/52	34,61%	RPL37A	4/81	4,94%	1/4	25,00%
TBP	47/81	58,02%	13/47	27,66%	HSPCB	4/81	4,94%	3/4	75,00%
18S	42/81	51,85%	7/42	16,67%	RPL32	4/81	4,94%	1/4	25,00%
PPIA	30/81	37,04%	9/30	30,00%	ATP5B	4/81	4,94%	2/4	50,00%
YWHAZ	30/81	37,04%	9/30	30,00%	EF1A	3/81	3,70%	2/3	66,67%
HMBS	29/81	35,80%	5/29	17,24%	TMBIM6	3/81	3,70%	2/3	66,67%
GUSB	29/81	35,80%	4/29	13,79%	G6PDH	3/81	3,70%	1/3	33,33%
RPLP0	26/81	32,10%	12/26	46,15%	PSMB6	3/81	3,70%	1/3	33,33%
SDHA	24/81	29,63%	8/24	33,33%	RPS13	3/81	3,70%	1/3	33,33%
UBC	22/81	27,16%	6/22	27,27%	CHCHD1	2/81	2,47%	1/2	50,00%
RPL13	20/81	24,69%	7/20	35,00%	GNB2L1	2/81	2,47%	1/2	50,00%
POLR2A	18/81	22,22%	4/18	22,22%	TPT1	2/81	2,47%	1/2	50,00%
PGK1	18/81	22,22%	2/18	11,11%	UBCH5B	2/81	2,47%	2/2	100,00%
TFRC	17/81	20,99%	4/17	23,53%	PSMC4	2/81	2,47%	1/2	50,00%
PUM1	16/81	19,75%	7/16	43,75%	ALG9	1/81	1,23%	1/1	100,00%
IPO8	13/81	16,05%	3/13	23,07%	CTBP1	1/81	1,23%	1/1	100,00%
MRPL19	8/81	9,87%	1/8	12,5%	CYCA	1/81	1,23%	1/1	100,00%
TUBB	7/81	8,64%	2/7	28,57%	DDX5	1/81	1,23%	1/1	100,00%
RPS17	7/81	8,64%	2/7	28,57%	HIST	1/81	1,23%	1/1	100,00%
CASC3	6/81	7,41%	2/6	33,33%	HUEL	1/81	1,23%	1/1	100,00%
EIF2B1	6/81	7,41%	2/6	33,33%	MDH1	1/81	1,23%	1/1	100,00%
PES1	6/81	7,41%	1/6	16,67%	RPL4	1/81	1,23%	1/1	100,00%
POP4	6/81	7,41%	2/6	33,33%	SRSF9	1/81	1,23%	1/1	100,00%
RPL30	6/81	7,41%	1/6	16,67%	TFCP2	1/81	1,23%	1/1	100,00%
ELF1	5/81	6,17%	2/5	40,00%	U6	1/81	1,23%	1/1	100,00%
PMM1	5/81	6,17%	1/5	20,00%	UBXN6	1/81	1,23%	1/1	100,00%
RPL29	5/81	6,17%	1/5	20,00%	VIL1	1/81	1,23%	1/1	100,00%
CDKN1β	5/81	6,17%	1/5	20,00%	ZNF410	1/81	1,23%	1/1	100,00%

In questi studi, l'algoritmo di normalizzazione più frequentemente utilizzato è stato *geNorm*, adoperato nell'83% degli studi, seguito da *NormFinder* nel 73% e *BestKeeper* nel 32% dei casi, mentre tutti i restanti sistemi di normalizzazione sono stati usati complessivamente nel 43% dei lavori (Figura 3).

È stata inoltre valutata la scelta di utilizzare uno o più sistemi di normalizzazione. Questa analisi ha mostrato che solo 20 degli 81 lavori esaminati (25%) impiegava un unico sistema di normalizzazione (*geNorm* in 8 dei 20 lavori) (Figura 4). Due o tre sistemi di normalizzazione erano impiegati rispettivamente nel 39% e nel 25% dei lavori. Dei 61 articoli che utilizzano più di un sistema, in 33 casi (57%) vi era concordanza tra i diversi sistemi normalizzanti nell'identificazione della rosa di geni più stabili.

Dei 133 geni analizzati nei diversi articoli, 62 geni sono risultati i più stabili dopo l'applicazione di algoritmi

normalizzanti (Tabella 1).

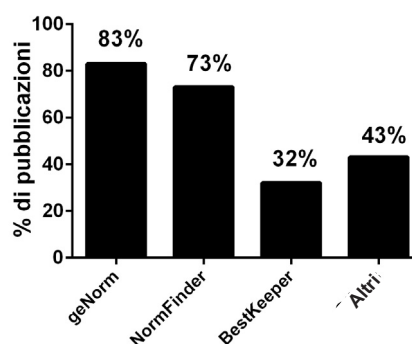


Figura 3
Frequenza dei principali sistemi analitici di normalizzazione. Istogramma della frequenza di uso dei principali algoritmi normalizzanti tra gli 81 studi presi in esame.

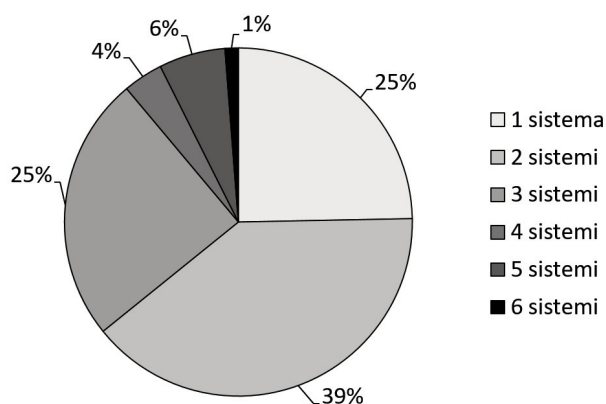


Figura 4
 Numero di sistemi normalizzanti utilizzati
 Distribuzione percentuale del numero di sistemi normalizzanti impiegati negli 81 studi presi in esame.

Solo in 3 casi non era stato possibile individuare geni sufficientemente stabili da impiegarsi per fini di normalizzazione.

Per quanto riguarda la verifica dell'aderenza alle linee guida MIQE e l'accuratezza con cui sono stati riportati dati relativi ad esperimenti di RT-qPCR, nessuno dei parametri presenti nella lista delle informazioni minime da riportare in pubblicazioni di dati con RT-qPCR era presente nella totalità degli studi (Figura 5). Le informazioni relative al kit o alle modalità di retrotrascrizione e alla DNA polimerasi erano presenti in più del 90% dei lavori, mentre dati relativi alla purezza ed integrità dell'RNA e al quantitativo di RNA impiegato per la retrotrascrizione erano presenti nel 65-77% degli studi.

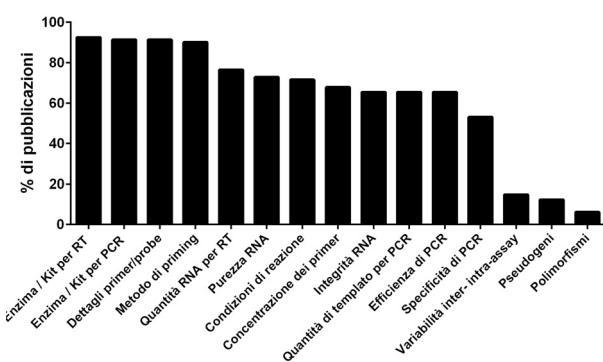


Figura 5
 Aderenza alle linee guida MIQE
 Istogramma della frequenza di aderenza alle linee guida MIQE tra gli 81 articoli presi in esame, sulla base della presenza di dati relativi a diversi parametri sperimentali.

Per quanto riguarda la scelta dei primer, nel 44% degli studi è stato incluso un saggio commerciale, nel 42% degli studi i primer sono stati disegnati *de novo* e nel 26% degli studi sono stati impiegati primer riportati in precedenti pubblicazioni scientifiche (la somma di queste tre percentuali supera il 100% alla luce dell'impiego di primer con diversa origine in diversi studi). Complessivamente, nel 91% degli studi erano riportati i dettagli (specie la sequenza) dei primer e delle eventuali sonde impiegati o, in alternativa, vi erano i riferimenti ai saggi commerciali impiegati (Figura 5).

Le informazioni relative alla reazione di amplificazione, incluse il quantitativo di template impiegato, la concentrazione finale di primer ed eventuali sonde e il protocollo di PCR erano presenti nel 65-72% degli studi (Figura 5).

Dati di efficienza della PCR erano riportati nel 65% dei lavori, anche se informazioni puntuali circa il range dinamico erano presenti solo nel 35% degli studi. Informazioni relative alla specificità della PCR, incluse l'analisi di curve di *melting* e/o la verifica della dimensione o sequenza dell'amplicone, erano riportate nel 53% dei lavori. Solo il 15% degli studi includeva informazioni relative alla riproducibilità intra- ed inter-assay (Figura 5).

Solo 10 lavori prendevano in considerazione l'eventualità che i saggi di PCR impiegati potessero risentire della presenza di pseudogeni, escludendo che i saggi impiegati amplificassero pseudogeni o verificando che l'amplificazione di pseudogeni fosse di entità trascurabile.

Abbiamo inoltre valutato se sia stata verificata l'assenza di *mismatch* di sequenza nei primer impiegati rispetto a polimorfismi noti. Tuttavia, solo 4 articoli su 81 hanno considerato specificamente questo aspetto durante la fase di disegno e selezione dei primer da utilizzare nell'esperimento di RT-qPCR. Infine, abbiamo investigato la frequenza con la quale primer impiegati presentavano *mismatch* di sequenza rispetto a mutazioni e polimorfismi noti sulla base dei portali Ensembl e dbSNPs, indagando in caso di *mismatch* la loro posizione all'interno dell'oligonucleotide. A tale scopo, abbiamo selezionato in modo casuale 15 coppie di primer di 15 geni da altrettanti articoli. Nessuno dei 30 primer indagati corrispondeva ad una regione genomica priva di mutazioni o polimorfismi noti (Figura 6). In media, erano presenti 7,5 *mismatch* per primer (intervallo: 1-20). 24 primer (80%) presentavano *mismatch* nelle ultime 5 posizioni in 3'. Complessivamente, soltanto per uno dei 15 geni investigati entrambi i primer risultavano privi di mutazioni e polimorfismi noti nelle ultime 5 basi in 3' (Figura 6).

DISCUSSIONE

Nel presente studio, abbiamo indagato le pratiche per l'identificazione di geni di riferimento in esperimenti di RT-qPCR e l'aderenza alle linee guida MIQE dei relativi articoli scientifici.

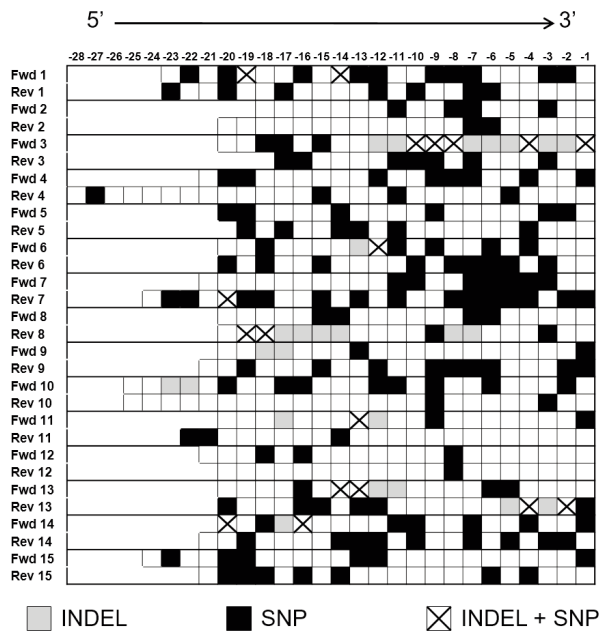


Figura 6

Localizzazione di mutazioni note nelle sequenze di un campione di 15 coppie di primer.

Localizzazione di inserzioni/delezioni note (INDEL), polimorfismi di singolo nucleotide noti (SNP) o entrambi (INDEL+SNP) nelle regioni genomiche corrispondenti ad un campione di 15 paia di primer (indicati come Fwd n e Rev n, dove Fwd e Rev indicano il primer senso e antisense, rispettivamente, e n indica il numero arbitrario della coppia di primer in esame). Ciascuna casella indica un nucleotide del primer, numerato da -1 in poi a partire dal terminale 3'.

Un risultato sorprendente, ma non inaspettato, della nostra revisione è che una piccola serie di candidati a geni di riferimento, vale a dire *GAPD*, *ACTB*, *B2M*, *HPRT* e *TBP*, compaiono nella maggior parte dei lavori. Questo è in linea con precedenti studi di letteratura e conferma la popolarità di questi come geni normalizzanti negli studi di RT-qPCR (4, 12, 39). Tale popolarità persiste nonostante le molteplici evidenze accumulate dalla letteratura scientifica che dimostrano come molti di questi geni mostrino spesso una espressione variabile in diverse condizioni sperimentali (16-24).

Lo studio dei sistemi normalizzanti utilizzati nei vari lavori ha confermato *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper* come algoritmi normalizzanti più usati. La scelta di impiegare più di uno di questi sistemi viene attuata nella maggior parte dei lavori. Benché non vi sia unanimità su quale linea adottare nel caso di risultati discordanti tra i diversi sistemi normalizzanti usati, nella maggior parte dei lavori considerati nel nostro studio si registra una sostanziale concordanza nell'identificazione dei geni più stabilmente espressi.

Al fine di determinare la qualità ed il grado di completezza dei dati riportati negli 81 studi presi in esame, è stata eseguita una valutazione di alcuni parametri cruciali in esperimenti di RT-qPCR, facendo

affidamento alle linee guida MIQE (5, 11).

Complessivamente, i risultati ottenuti mostrano una maggiore aderenza alle linee guida MIQE rispetto a quanto rilevato in una estesa indagine della letteratura del 2013 (5).

Sebbene tale miglioramento possa far pensare ad una maggior implementazione delle linee guida MIQE negli ultimi anni, occorre considerare che, a differenza della precedente indagine, il nostro studio era specificatamente focalizzato su lavori metodologici improntati su studi di RT-qPCR, in cui pertanto era prevedibile una maggiore aderenza alle linee guida stesse.

Ciononostante, alcuni aspetti rilevati dalla nostra indagine sollevano alcune perplessità. Ad esempio, il 17% di questi lavori non riportavano dettagli sulle sequenze di primer/sonde impiegati. Tale dato è al netto dei lavori che impiegano saggi commerciali, per i quali è noto che le sequenze di primer e sonde impiegate spesso non sono rese pubbliche (40).

Tale mancanza appare ancora più inspiegabile data la tipologia di lavori analizzati, il cui scopo dovrebbe essere quello di rendere disponibile alla comunità scientifica informazioni relative a saggi di RT-qPCR per geni stabili in un dato contesto sperimentale.

Una simile considerazione si può estendere all'assenza di dati di validazione tecnica dei saggi impiegati, inclusi dati sul range dinamico e sulla variabilità inter- e intra-assay, in una percentuale non trascurabile dei lavori presi in esame.

Gli aspetti in assoluto più ignorati negli articoli esaminati riguardano la possibile interferenza della presenza di pseudogeni, mutazioni e polimorfismi noti, sebbene le linee guida e la letteratura scientifica recente richiamino l'attenzione su questi aspetti (11, 25, 41).

Infatti, è stato dimostrato che la presenza di polimorfismi di singoli nucleotidi o di altri *mismatch* di sequenza tra primer e template può ridurre la prestazione di saggi di qPCR (41), e che tale effetto deleterio dovuto ai *mismatch* dipenda dal numero di *mismatch* e dalla loro posizione, con interferenza maggiore nel caso di *mismatch* nelle ultime quattro posizioni al terminale 3' dell'oligonucleotide (41).

La presenza di mutazioni o polimorfismi noti nelle regioni genomiche corrispondenti ai primer di un saggio di qPCR è una eventualità da non trascurare, alla luce dell'elevato numero di polimorfismi noti (in media 1 SNP per 58 paia di basi (bp) nell'intero genoma, in media 1 SNP per 20 bp nell'esoma, in base alla versione dbSNP 137, come precedentemente riportato (41)). I risultati delle nostre analisi di un piccolo campione di primer conferma la rilevanza di questo fenomeno.

Peraltro, il numero di mutazioni e polimorfismi è destinato ad aumentare, in virtù dell'ampio impiego di metodiche di sequenziamento di nuova generazione, inclusi sequenziamento dell'intero genoma o esoma, su larga scala. Nonostante si preveda che questo renderà pressoché impossibile disegnare primer o sonde in regioni totalmente prive di polimorfismi, è comunque auspicabile tenere in considerazione questi aspetti ed

evitare polimorfismi presenti in frequenze più elevate nella popolazione di interesse. A tal fine, si segnala come le informazioni di frequenza di ciascun polimorfismo nelle diverse popolazioni siano facilmente reperibili nelle banche dati di sequenza.

La nostra indagine ha mostrato come la RT-qPCR permanga una metodica ampiamente impiegata per studi trascrizionali, nonostante la disponibilità di metodi che consentono studi trascrizionali globali, cosiddetti trascrittomici, a costi via via sempre più contenuti. Pertanto, rimane viva la necessità di: individuare geni stabili per la normalizzazione dei dati di RT-qPCR; disegnare e validare opportuni saggi di qPCR per questi geni; riportare i risultati di questi studi nel modo più trasparente e chiaro possibile garantendo la riproducibilità.

Per il primo aspetto, proprio la disponibilità di dati di trascrittomica di pubblico e facile accesso potrebbe essere sfruttata a beneficio della identificazione di geni candidati alla normalizzazione di esperimenti di RT-qPCR in un dato contesto clinico o sperimentale (42). Ad esempio, il portale Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) un archivio pubblico di dati genomici funzionali, che fa parte del *National Center for Biotechnology Information*, potrebbe trovare impiego per questo fine. Infatti, GEO include set di dati trascrittomici basati sia su microarray, sia su sequenziamento dell'RNA, i quali sono conformi rispettivamente alle linee guida sulle informazioni minime per un esperimento di microarray [MIAME, dall'inglese *Minimum Information About a Microarray Experiment*(43)] e alle linee guida sulle informazioni minime su un esperimento di sequenziamento di nuova/ultima generazione [MINSEQE, dall'inglese *Minimum Information About a Next-generation Sequencing Experiment*, <http://fged.org/projects/minseqe/>].

Una possibile valida alternativa è stata realizzata da Hruz et al. nel 2011, i quali hanno fondato *RefGenes*, una piattaforma che consente la selezione di geni di riferimento adatti per studi RT-qPCR, benché questa piattaforma sia accessibile esclusivamente ad utenti registrati e sia basata esclusivamente su dati di microarray (42).

Al contrario, GEO garantisce un accesso pubblico illimitato e incorpora dati di microarray e di sequenziamento dell'RNA.

In relazione al disegno e alla validazione dei saggi di qPCR, le linee guida MIQE evidenziano già in modo chiaro gli elementi più importanti di questo aspetto. Rimane invece il problema della loro implementazione sistematica in studi che includono dati RT-qPCR, come già osservato in precedenza (5) e confermato anche dal nostro studio. Pertanto, sarebbe auspicabile individuare strategie per garantire la piena implementazione di tali linee guida. Un esempio di questo tipo potrebbe essere rappresentato dalle linee guida ARRIVE (dall'inglese *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) che identificano degli standard per riportare risultati di

sperimentazioni animali nell'ambito di pubblicazioni scientifiche (44). Numerose riviste scientifiche hanno infatti imposto di implementare tali linee guida, anche tramite l'uso di un apposito formulario, per tutti i lavori che includono sperimentazioni animali.

Alla luce del largo impiego della RT-qPCR, ancora in questi ultimi anni, e della sua rilevanza in ambito di ricerca di base e diagnostica molecolare, ogni sforzo teso al miglioramento delle pratiche di utilizzo e delle modalità di pubblicazioni dei dati relativi appare estremamente importante.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Bustin SA, Wittwer CT. MIQE: A step toward more robust and reproducible quantitative PCR. *Clin Chem* 2017;63:1537-8.
2. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 1992;10:413-7.
3. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
4. Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6:279-84.
5. Bustin SA, Benes V, Garson J, et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods* 2013;10:1063-7.
6. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002;48:1178-85.
7. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-305.
8. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190-212.
9. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 2006;27:192-223.
10. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (London)* 2005;109:365-79.
11. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611-22.
12. Dijkstra JR, van Kempen LC, Nagtegaal ID, et al. Critical appraisal of quantitative PCR results in colorectal cancer research: can we rely on published qPCR results? *Mol Oncol* 2014;8:813-8.
13. Tanaka S, Furukawa T, Plotkin SA. Human cytomegalovirus stimulates host cell RNA synthesis. *J Virol* 1975;15:297-304.
14. Piechaczyk M, Blanchard JM, Marty L, et al. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res* 1984;12:6951-63.
15. Stout JT, Chen HY, Brennand J, et al. Expression of human HPRT in the central nervous system of transgenic mice. *Nature* 1985;317:250-2.
16. Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, et al. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard

- for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 2001;295:17-21.
17. Nazari F, Parham A, Maleki AF. GAPDH, beta-actin and beta2-microglobulin, as three common reference genes, are not reliable for gene expression studies in equine adipose- and marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Anim Sci Technol* 2015;57:18.
 18. Zhou L, Lim QE, Wan G, et al. Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells. *BMC Genomics* 2010;11:75.
 19. Yang X, Hatfield JT, Hinze SJ, et al. Bone to pick: the importance of evaluating reference genes for RT-qPCR quantification of gene expression in craniosynostosis and bone-related tissues and cells. *BMC Res Notes* 2012;5:222.
 20. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, et al. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004;59:566-73.
 21. Bémeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, et al. Decreased β -actin mRNA expression in hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience letters* 2004;357:211-4.
 22. Schulz WA, Eickelmann P, Hallbrucker C, et al. Increase of β -actin mRNA upon hypotonic perfusion of perfused rat liver. *FEBS letters* 1991;292:264-6.
 23. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002;309:293-300.
 24. Koch I, Weil R, Wolbold R, et al. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1108-14.
 25. Sun Y, Li Y, Luo D, et al. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS One* 2012;7:e41659.
 26. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005;344:141-3.
 27. Piehler AP, Grimholt RM, Ovstebo R, et al. Gene expression results in lipopolysaccharide-stimulated monocytes depend significantly on the choice of reference genes. *BMC Immunol* 2010;11:21.
 28. Retraction. Alternative splicing produces high levels of noncoding isoforms of bHLH transcription factors during development. *Genes Dev* 2011;25:1344.
 29. Alberts B. Retraction. *Science* 2011;334:1636.
 30. Bohlenius H, Eriksson S, Parcy F, et al. Retraction. *Science* 2007;316:367.
 31. Takahashi K, Ikeda N, Nonoguchi N, et al. Enhanced expression of coproporphyrinogen oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence. *Neuro Oncol* 2011;13:1234-43.
 32. Sanders R, Bustin S, Huggett J, et al. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. *Biomol Detect Quantif* 2018;15:13-7.
 33. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
 34. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004;26:509-15.
 35. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245-50.
 36. Silver N, Best S, Jiang J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006;7:33.
 37. Xie F, Xiao P, Chen D, et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* 2012.
 38. Bustin SA. The reproducibility of biomedical research: Sleepers awake! *Biomol Detect Quantif* 2014;2:35-42.
 39. Ceelen L, De Spiegelaere W, David M, et al. Critical selection of reliable reference genes for gene expression study in the HepaRG cell line. *Biochem Pharmacol* 2011;81:1255-61.
 40. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. Primer sequence disclosure: a clarification of the MIQE guidelines. *Clin Chem* 2011;57:919-21.
 41. Lefever S, Pattyn F, Hellemans J, et al. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. *Clin Chem* 2013;59:1470-80.
 42. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, et al. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 2017;13:e1005457.
 43. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29:365-71.
 44. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS biology* 2010;8:e1000412.

Gammopatie monoclonali: quadri clinici principali e ruolo del laboratorio

Fausto Adami¹, Tamara Berno², Marcello Riva², Federica Lessi², Maria Stella Graziani³

¹Studio Senior, Università di Padova

²Ematologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina, Università di Padova

³Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

ABSTRACT

Monoclonal gammopathies: main clinical pictures and role of the clinical laboratory. The finding of a monoclonal gammopathy both by chance and upon clinical suspicion is becoming more and more frequent and requires in-depth clinical, laboratory and instrumental analyses in order to establish the underlying disease, if any. In the last two decades the improvement of the diagnostic tools has led to the identification and precise definition of several clinical entities pathogenetically linked to the monoclonal gammopathy, thus shrinking the field of the "monoclonal gammopathy of undetermined significance". Such a striking improvement relies on the increasing sensitivity and accuracy of old analyses and availability of new ones (such as the serum Free Light Chain assay). Currently, data from the clinical biochemistry laboratory provide important clues to the diagnosis and prognosis, and are also crucial for monitoring the therapy. These new achievements, along with the availability of new therapeutic options, allowed a significant, sometimes dramatic improvement of the prognosis of many of the gammopathy-related diseases. In this review the main clinical pictures are described along with the contribution of the clinical biochemistry laboratory to the definition of the diagnosis, the risk profile and the monitoring of the specific diseases.

GENERALITÀ

Definizione

Il termine gammopatia monoclonale (GM) include una vasta gamma di situazioni di significato biologico e/o clinico che hanno in comune una proliferazione clonale di plasmacellule o di linfociti B secernenti il prodotto della cui attività è generalmente rilevabile nel siero e/o nelle urine. Questo prodotto consta di immunoglobuline monoclonali intere o loro frammenti (catene leggere, catene pesanti) e vanno sotto il nome di componenti monoclonali (CM). Rilevare, caratterizzare e misurare la CM è di fondamentale importanza nel guidare la diagnosi iniziale, stratificare il rischio di una eventuale progressione e nel monitorare la risposta alla terapia. Scopo di questa rassegna è presentare i principali quadri clinici correlati a GM, illustrandone i diversi aspetti (eziologia, diagnosi, prognosi, terapia). Per ognuno di essi viene illustrato il sostanziale contributo del laboratorio nei diversi contesti clinici, evidenziando come le manifestazioni estremamente pleomorfe e spesso

subdole di queste entità richiedano un alto grado di sospetto clinico e una costante collaborazione tra clinico e laboratorista per una appropriata gestione di questi pazienti.

Metodologia di laboratorio

Il laboratorio è indispensabile in ogni fase della storia clinica dei pazienti con GM; il Gruppo di Studio "Proteine" di SIBioC ha prodotto una serie di documenti ai quali si rimanda per informazioni più dettagliate (1-3). L'elettroforesi delle sieroproteine (S-EF) è la tecnica che consente di rilevare l'omogeneità chimico-fisica della proteina secreta dal clone plasmacellulare ed è quindi, al momento, l'esame di elezione per la rilevazione delle CM sieriche e per la loro quantificazione. La spettrometria di massa sta emergendo come esame alternativo e accreditato del superamento delle diverse problematiche che affliggono la S-EF (4). La S-EF viene eseguita sia a scopo di screening per la ricerca di una eventuale CM, sia per il monitoraggio del paziente con

Corrispondenza a: Fausto Adami, Studio Senior Università di Padova, Tel +39 041715277, E-mail f.adami@unipd.it

Ricevuto: 18.07.2019

Revisionato: 20.09.2019

Accettato: 03.10.2019

Pubblicato on-line: 15.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.070

CM (3).

La caratterizzazione immunologica delle CM viene effettuata con immunofissazione su agarosio (S-IF) o con immunosottrazione con tecnica capillare (S-IS); è necessaria per la conferma della natura immunoglobulinica della CM evidenziata al tracciato elettroforetico e consente di identificare l'isotipo della catena pesante e la classe della catena leggera della immunoglobulina secreta dal clone (3). La S-IF consente inoltre di evidenziare CM non rilevabili al tracciato elettroforetico o perché presenti in scarsa quantità (cloni oligosecernenti o secernenti IgD o IgE o catene leggere) o perché nascoste da altre proteine presenti fisiologicamente e migranti nella stessa zona elettroforetica (2,3).

La determinazione della proteina di Bence Jones (PBJ) si esegue con una immunofissazione urinaria (U-IF), come raccomandato internazionalmente (5,6) per consentire la messa in evidenza delle due caratteristiche della proteina (monoclonalità e l'assenza della catena pesante), mentre la sua quantificazione richiede un campione temporizzato sul quale effettuare una scansione densitometrica del picco evidenziato e misurato in rapporto alle proteine totali urinarie (3,7,8). Le metodiche utilizzate mostrano tuttavia una serie di problemi tecnici ad oggi non interamente risolti (3,5,6).

La quantificazione nefelometrica delle catene leggere libere del siero kappa (κ) e lambda (λ) (serum Free Light Chain, sFLC), sviluppata nei primi anni 2000 (9,10) ha segnato un rilevante avanzamento nella diagnostica e nel monitoraggio laboratoristico dei pazienti con GM. Uno sbilanciamento quantitativo delle concentrazioni delle catene leggere libere kappa e lambda (rappresentato dal rapporto κ/λ , rFLC) viene ritenuto (sia pure con alcune riserve e cautele) una prova indiretta di clonalità. Questo esame fa oramai indiscutibilmente parte del pannello iniziale della valutazione di un paziente con CM (provata o sospetta) (10) ed è in grado di rivelare e misurare una CM a catene leggere in quasi tutti i pazienti con malattia non secernente od oligosecernente e con amiloidosi AL (11). La misura delle sFLC può sostituire in alcuni casi la determinazione della PBJ (8,12); tuttavia nella amiloidosi AL ed in altre situazioni caratterizzate da CM esigue o comunque elusive, la misura delle sFLC deve comunque essere associata ad S-IF ed U-IF per garantire la massima sensibilità diagnostica (13).

Il laboratorio è poi presente nella gestione del paziente con CM con altri esami al di fuori della diagnostica proteica, con determinazioni mirate alla verifica di un eventuale danno d'organo causato dal clone plasmacellulare. Tra queste rientrano la misurazione della creatinina sierica, della stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR), delle proteine totali urinarie e della albumina urinaria relative al danno renale, la determinazione della emoglobina per la rilevazione della anemia, la misura del calcio sierico per la valutazione del versante osseo del mieloma multiplo (3,14) e la misura del frammento aminoterminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) e delle

troponine cardiache per la messa in evidenza e il monitoraggio del danno cardiaco nella amiloidosi AL (15).

Significato clinico delle gammopatie monoclonali

La CM e/o un anomalo rFLC sono potenzialmente spie di malattie conclamate di natura linfoproliferativa [Mieloma Multiplo (MM), Macroglobulinemia di Waldenström (WM), altri linfomi], amiloidosi AL e altre malattie da deposito, sindrome POEMS (acronimo Inglese delle principali manifestazioni della malattia: Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal gammopathy e Skin changes); altre volte la CM è eziologicamente o patogeneticamente coinvolta in patologie a carico di reni [Monoclonal Gammopathy of Renal Significance (MGRS)] (16), cute, vasi, sistema nervoso periferico (crioglobulinemia tipo I o II), sistema coagulativo. In altre situazioni il coinvolgimento patogenetico della CM è probabile ma non ancora chiarito. È stato recentemente proposto di includere queste manifestazioni in un più ampio gruppo di "Monoclonal Gammopathy of Clinical Significance" (MGCS) (17), da opporre a quelle situazioni nelle quali la CM è espressione di malattie linfoproliferative né è correlata ad altre manifestazioni cliniche e viene perciò definita di "significato incerto/indeterminato" (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance - MGUS). Quando si ha quindi a che fare con una CM occorre indagare sia le possibili manifestazioni del clone in quanto tale, sia le manifestazioni ascrivibili alla CM stessa che può essere patogena quando abbia proprietà anticorpali (esempio: le IgM monoclonali *versus* IgG policlonali della crioglobulinemia di tipo II HCV-correlata) o semplicemente per sue proprie caratteristiche e interazioni chimico-fisiche (sindrome da iperviscosità). Il termine MGUS è quindi una diagnosi che richiede preventivamente l'esclusione di processi patologici correlati alla GM; di conseguenza i termini GM e MGUS non sono affatto sinonimi.

ENTITÀ CLINICHE

Gammopatie monoclonali di incerto significato

Epidemiologia

Le MGUS sono certamente le più frequenti forme di disordine plasmacellulare, rappresentando da sole circa il 70% di tutti i quadri correlati a CM. Le MGUS sono riscontrate per la massima parte occasionalmente, cioè nel corso di esami di laboratorio in soggetti in buona salute o eseguiti per le motivazioni più varie. Un paziente con MGUS ha una CM sierica inferiore a 30 g/L, plasmacellule clonali midollari inferiori al 10% in assenza di danno d'organo, nel mieloma identificato con l'acronimo Inglese CRAB - [iperCalcemia (C), insufficienza Renale (R), Anemia (A) e lesioni ossee (B)] (14). I cloni che secernono CM IgM hanno caratteristiche

biologiche, cliniche ed evolutività diverse da quelli che producono CM non-IgM (vedi oltre). La sensibilità della metodica impiegata per rilevare la CM può influire sui risultati degli studi volti a definirne la prevalenza [l'elettroforesi capillare (CZE) possiede una maggiore sensibilità della S-EF eseguita in gel di agarosio] che dipende da età, etnia, stato di salute delle popolazioni oggetto di studio e, probabilmente, dall'accessibilità alle risorse diagnostiche di laboratorio. Nella popolazione generale, la prevalenza delle MGUS, incluse le cosiddette *light-chain MGUS* (MGUS la cui CM è costituita da sole catene leggere) aumenta con l'età ed è attorno allo 0,34% fino ai 50 anni (18). La categoria delle *light-chain MGUS* è stata di recente introdotta grazie alla disponibilità della misura delle sFLC ed è definita da un anomalo rFLC per aumento della concentrazione di una delle due catene leggere (comunque con rapporto tra catena leggera coinvolta e non coinvolta sempre <100), in assenza di catene pesanti monoclonali (19) e di danno d'organo. Nel caso di CM a catene leggere deve essere valutata anche la possibilità di un danno d'organo da amiloidosi, radicalmente differente da quello del mieloma, identificato dai parametri CRAB (Tabella 1).

Tabella 1

Light Chain MGUS: criteri diagnostici

Anomalo rFLC (<0,26 o >1,65) associato ad aumento della catena leggera coinvolta (kappa se rFLC >1,65 o lambda se rFLC <0,26)

Nessuna catena pesante rilevabile alla immunofissazione

Assenza di CRAB/MDE e di manifestazioni da amiloidosi / LCDD

Plasmacellule midollari clonali <10%

Componente monoclonale urinaria (Proteina di Bence Jones) <500 mg/24h

MGUS, gammopatia monoclonale di incerto significato; rFLC, rapporto fra catene leggere libere kappa e lambda; CRAB, acronimo del danno d'organo (ipercalcemia, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee); MDE, myeloma defining events; LCDD, light chain deposition disease.

A età maggiori la prevalenza delle MGUS è rispettivamente del 2,2%, 4%, 6% e 8,7% dai 50, 60, 70 e 80 anni (18,19). La prevalenza è maggiore negli uomini rispetto alle donne (19) e via via, nelle etnie nera, caucasica (18-21) e asiatica (22). La maggiore prevalenza nella etnia nera anche dopo aggiustamento dello stato socioeconomico, suggerisce una predisposizione su base etnica (21). Una prevalenza alquanto superiore (5,7% e 7,7% dai 60 e 70 anni rispettivamente) è stata registrata in 44 474 soggetti ambulatoriali consecutivi italiani (23). È probabile che questa maggiore prevalenza sia correlata alla accessibilità all'indagine di laboratorio permessa dalla copertura dei costi garantita dal Servizio Sanitario

Nazionale anche per esami di screening. L'incidenza annuale delle MGUS è di 500 casi/100 000 persone/anno ed aumenta con l'età (24). I familiari di primo grado dei soggetti portatori di MGUS hanno un rischio triplo di sviluppare una MGUS anch'essi, rispetto alla popolazione generale (25). È ormai consolidato che la quasi totalità delle malattie come MM (26,27), WM (28) e amiloidosi AL (29) siano costantemente precedute da una MGUS. Il più frequente isotipo della catena pesante è la IgG (69%), seguito da IgM (15%), IgA (15%) (30,31); rare le IgD e gli isotipi biconali, rarissime le IgE. Le *light-chain MGUS* costituiscono circa l'1% di tutte le MGUS (19).

Eziologia

Non si hanno dati certi circa possibili cause delle MGUS, anche se è probabile il contributo di fattori ambientali. Fra questi, l'esposizione in giovane età a radiazioni ionizzanti (32), l'impiego professionale di pesticidi (33) e, ancorché dibattuta, l'esposizione prolungata al benzene (34-36).

Prognosi

Fatta eccezione per le GM transitorie che occorrono tipicamente nel corso di patologie infettive [da infezioni virali (*Citomegalovirus*, *Epstein Barr virus*), da *Mycoplasma Pneumoniae*], di reazioni a farmaci, dopo un trapianto di cellule staminali emopoietiche (37) o per trasferimento placentare nel neonato, le GM persistono per tutta la vita e una parte di esse evolve verso una malattia linfoproliferativa conclamata. Componenti monoclonali non-IgM dispiegano il potenziale evolutivo principalmente verso il MM; CM IgM possono evolvere in WM; CM a catene leggere evolvono verso il MM a catene leggere (Light Chain Multiple Myeloma - LCMM) (conosciuto anche con il termine da abbandonare di "mieloma micromolecolare") e la amiloidosi AL o la *Light Chain Deposition Disease*. Il rischio evolutivo persiste per tutta la vita. Almeno per quanto attiene al rischio evolutivo a MM e WM, conosciamo il tasso globale medio di evoluzione che si stima attorno all'1% annuo che è però influenzato in maniera non precisamente ponderabile da svariati parametri. Fra i dati meno recenti emerge in maniera consistente un fattore di rischio che potremmo definire il "burden" neoplastico. Questo parametro può essere sia misurato in termini diretti (quota dell'infiltrato midollare plasmacellulare), sia desunto indirettamente dalla concentrazione della CM del siero (38,39). La concentrazione della CM del siero è probabilmente il singolo parametro maggiormente predittivo della progressione (30) mentre l'incremento della concentrazione nei primi 3 anni identifica pazienti ad alto rischio di progressione (40). L'isotipo IgG conferisce il minore rischio di progressione e l'isotipo IgA il rischio maggiore. Una probabile spiegazione consiste nel fatto che le IgA hanno una emivita molto più breve (5,8 *versus* 23 giorni) (41,42), quindi la loro concentrazione sottostima la massa plasmacellulare

intramidollare rispetto alla stima fornita dalle concentrazioni di IgG. I pazienti nei quali, grazie alla maggiore sensibilità delle attuali metodiche di laboratorio, viene rilevata una CM di piccola entità, sembrano avere una sopravvivenza globale sovrapponibile a quella della popolazione generale (43). Tali CM non devono comunque essere trascurate poiché possono essere correlate a patologie anche serie (MGCS). Inoltre, una consistente quota di pazienti di età avanzata cui viene diagnosticata una MGUS, decede a causa di malattie diverse da quelle direttamente correlate alla CM stessa (30).

Relativamente alla determinazione del rFLC, è dimostrato che un alterato rFLC è prognosticamente sfavorevole quanto al rischio di evoluzione della MGUS, con rischio progressivamente maggiore al crescente allontanamento del dato dal suo intervallo di riferimento. Dall'analisi multivariata sono emersi come rischi addizionali le componenti non-IgG e le CM >15g/L, con rischio progressivamente crescente in presenza di nessuno, uno, due o tutti i tre fattori (44) (Tabella 2). Attualmente questo profilo di rischio usato nella clinica per stabilire le modalità del monitoraggio dei pazienti con MGUS, una problematica che da qualche tempo si è imposta per le sue implicazioni anche economiche.

Tabella 2

Criteria prognostici MGUS (IgG e IgA)
Fattori di rischio (dal riferimento 10)

Componente Monoclonale non IgG
Concentrazione della Componente Monoclonale >15 g/L
rFLC <0,25 o >4

Il rischio di progressione a Mieloma Multiplo a 20 anni con 0, 1, 2, 3 fattori di rischio è rispettivamente del 5%, 21%, 37%, 58%.

MGUS, gammopatia monoclonale di incerto significato; rFLC, rapporto fra catene leggere libere kappa e lambda.

Monitoraggio

Sulla base dei fattori di rischio poc'anzi delineati, viene suggerito che i pazienti ai quali viene diagnosticata una MGUS vengano inizialmente controllati ogni 6 mesi per 3 volte; successivamente ogni 2 o 3 anni (pazienti a basso rischio – assenza di fattori di rischio) od ogni 6/12 mesi (pazienti a rischio intermedio o alto – presenza di 1, 2 o 3 fattori) (45). L'applicazione di questo modello di rischio non è tuttavia scevra da pericoli giacché sono stati già in passato segnalate consistenti quote di pazienti con CM stabile nel tempo e non rientranti fra le MGUS ad alto rischio che ugualmente sono evoluti a MM (26,27).

Gli eventi che definiscono la progressione sono laboratoristici, strumentali e clinici. Per esempio, la progressione verso il MM franco è definita dai criteri CRAB. Più recentemente, sono stati individuati criteri quali: plasmacellule clonali midollari $\geq 60\%$; rapporto tra

catena leggera coinvolta/non-coinvolta ≥ 100 (46,47) e più di 1 lesione intramidollare del diametro di 5 mm alla Risonanza Magnetica (RM) (48). Ciascuno di questi criteri identifica un sottogruppo di pazienti che, pure asintomatici e senza danno d'organo secondo criteri CRAB, hanno un rischio dell'80% di sviluppare MM franco entro due anni. Tali criteri vengono perciò identificati come *Myeloma Defining Events* (MDE) (49) e ciascuno di essi implicitamente consente di porre diagnosi di MM e di intraprendere i provvedimenti terapeutici anche in assenza di danno d'organo definito dai tradizionali criteri CRAB (Tabella 3). La progressione verso la WM od altri linfomi tipo leucemia linfatica cronica (LLC) è definita dallo sviluppo di anemia, piastrinopenia, iperviscosità plasmatica o da adenopatia e splenomegalia oltre che da sintomi costituzionali (febbre, dimagrimento). La progressione verso l'amiloidosi e lo sviluppo dei principali danni d'organo ad essa ascrivibili deve essere monitorato con l'utilizzo di biomarcatori quali NT-proBNP, proteinuria, fosfatasi alcalina sierica.

Lo sviluppo di questi eventi deve essere costantemente monitorato e l'estremo pleomorfismo delle possibili manifestazioni rende ragione della complessità e dei costi correlati al monitoraggio di questi pazienti. Dopo un iniziale scetticismo sull'eventuale beneficio del monitoraggio dei pazienti con MGUS (50), dati più recenti hanno posto in evidenza che fra i pazienti che hanno sviluppato MM, quelli che erano seguiti per una precedente MGUS hanno avuto ridotte complicanze e un vantaggio di sopravvivenza rispetto a quelli che non erano sottoposti a regolare monitoraggio (51,52).

Ruolo del laboratorio

Da questi dati si evince che dopo il rilievo, la caratterizzazione e la misurazione della CM, il laboratorio è direttamente e prioritariamente coinvolto anche nella definizione del rischio evolutivo e nella gestione del monitoraggio e spesso fornisce gli elementi di sospetto che inducono all'esecuzione di indagini invasive (biopsia osteomidollare) e talvolta anche più costose [Tomografia Computerizzata (TC) e/o RM e/o Tomografia ad emissione di positroni (PET-TC)]. Il dato di laboratorio offre inoltre preziosi indizi nella diagnosi differenziale verso altre situazioni patologiche, comuni nella popolazione generale (anemia, ipercalcemia, ipercreatininemia) ma non correlate alla gammopatia.

Gammopatie monoclonali di significato renale

Le MGRS costituiscono un insieme di situazioni di relativamente recente enucleazione (16); i criteri per questa definizione sono stati recentemente aggiornati e riportati in un esaustivo *Consensus Statement* al quale si rimanda per approfondimenti (53). La nuova definizione comprende tutte le malattie linfoproliferative secernenti che non richiedono un trattamento per la malattia ematologica in sé e stabilisce che il danno renale è conseguenza diretta della immunoglobulina

Tabella 3

Criteria diagnostici per MGUS, Mieloma Multiplo Smoldering, Mieloma Multiplo. Componenti monoclonali IgG e IgA (modificata dal riferimento 13).

Parametro	MGUS	Mieloma Multiplo Smoldering	Mieloma Multiplo
Concentrazione sierica della componente monoclonale	<30 g/L e	≥30 g/L e/o	Qualsivoglia
Infiltrazione midollare da plasmacellule clonali	<10% e	10-60%	≥10% o diagnosi istologica di plasmocitoma
Sintomi e/o danno d'organo	nessuno non CRAB*, non MDE°	nessuno non CRAB*, non MDE°	almeno 1 MDE°

*Definizione di CRAB: **C**, Ipercalcemia (calcemia >2,75 mmol/L); **R**, Insufficienza renale (creatinina clearance <40mL/minuto o S-Creatinina >173 μmol/L); **A**, Anemia (emoglobina inferiore di 20 g/L al limite inferiore dell'intervallo di riferimento per sesso ed età); **B**, Lesioni ossee (una o più lesioni litiche alla radiografia convenzionale o alla Tomografia Computerizzata low-dose o alla Tomografia ad emissione di positroni)

°Definizione di MDE (Myeloma Defining Events): Infiltrato plasmacellulare midollare ≥60%; Rapporto fra catena leggera coinvolta/non coinvolta ≥100 (con catena coinvolta ≥100 mg/L); Due o più lesioni focali alla Risonanza Magnetica (ciascuna con Ø ≥5 mm).

MGUS, gammopatia monoclonale di significato non determinato

monoclonale nefrotossica secreta. La immunoglobulina nefrotossica è documentabile sulla biopsia renale, salvo che in alcune circostanze come la glomerulonefrite C3 e la microangiopatia trombotica. In queste due malattie i depositi renali di immunoglobuline monoclonali o sono mascherati e richiedono particolari procedure di trattamento del tessuto biotico per essere evidenziati (glomerulopatia C3), o non vi sono affatto (microangiopatia trombotica). In questa ultima circostanza si assume un ruolo patogenetico della CM per la frequente associazione della nefropatia con il MM o la WM (53-55). Oltre ai consueti parametri biochimici, strumentali e morfologici impiegati nella valutazione della malattia linfoproliferativa clonale, la diagnosi di MGRS richiede obbligatoriamente la biopsia renale sulla quale vengano eseguiti studi morfologici, di immunofluorescenza e di microscopia elettronica. È stato descritto, prima della identificazione di queste entità cliniche, che solo nel 55% dei pazienti con nefropatia e CM, la prima sia stata patogeneticamente correlata alla seconda (56); tuttavia è verosimile che questo numero sia destinato ad aumentare con la progressiva diffusione della consapevolezza di questo rapporto. I quadri renali associati a GM sono la glomerulonefrite C3, la glomerulonefrite mesangio-proliferativa, la tubulopatia prossimale da catene leggere, la glomerulonefrite crioglobulinemica e le malattie da deposito fibrillare (AL amiloidosi) e non fibrillare di immunoglobuline monoclonali, queste ultime racchiuse nel termine *Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease* (MIDD).

Gammopatie monoclonali di significato clinico

Si tratta di un concetto che include tutti i quadri clinici, oltre alle nefropatie di cui si è parlato sopra, nei quali si verifica un danno d'organo quale conseguenza degli effetti biologici di una immunoglobulina monoclonale secreta da un clone B-linfocitario/plasmacellulare. Come per le MGRS, anche per le MGCS il danno d'organo va identificato e va stabilita la correlazione con il clone coinvolto che è di solito quantitativamente contenuto e quiescente dal punto di vista della cinetica proliferativa. Per tutte le entità non affrontate esplicitamente in questa rassegna, si rimanda allo *Special Report* del 2018 che ha introdotto questo nuovo concetto (17).

Mieloma multiplo smoldering

Definizione

Si tratta di una condizione intermedia fra MGUS e MM. Nel Mieloma Multiplo *smoldering* (SMM), la CM, usualmente IgG o IgA, è ≥30 g/L e/o le plasmacellule clonali midollari sono ≥10%, in assenza di sintomi correlati e di danno d'organo (CRAB). (Per i criteri di diagnosi differenziale con MGUS e MM, si veda la Tabella 3). Lo SMM costituisce circa il 10% di tutti i MM.

Prognosi

Con il tempo si è dimostrato come sotto la dizione di SMM siano comprese un gruppo molto eterogeneo di situazioni. I pazienti con SMM hanno un rischio evolutivo

verso il MM franco del 10% annuo nei primi 5 anni; poi del 5% annuo per i successivi 5 anni; in seguito il rischio evolutivo è dell'1% annuo, sovrapponibile al rischio dei pazienti con MGUS (57). Ne consegue che la strategia limitata al monitoraggio vigile risulta inadeguata nei confronti del primo gruppo di pazienti, specie da quando recentemente si sono rese disponibili opzioni terapeutiche più maneggevoli ed è stato dimostrato che l'intervento precoce [cioè senza attendere il danno d'organo (CRAB)] ritarda la progressione a malattia attiva e aumenta la sopravvivenza (58). Sono stati proposti numerosi parametri indicativi di rischio evolutivo (59); il più agevolmente adottabile è quello proposto da Dispenzieri et al. (60) che si basa, tra l'altro, sulla quantificazione della CM e sul rFLC (Tabella 4).

Tabella 4

Criteri prognostici Mieloma Multiplo Smoldering (IgG e IgA) (3 fattori di rischio; modello Mayo Clinic, dal riferimento 56)

Parametro		Rischio relativo
Infiltrazione midollare da plasmacellule clonali	>10%	3,1
Concentrazione della componente monoclonale sierica	>30 g/L	1,9
rFLC	>8 o <0,125	1,9

La mediana di progressione a Mieloma Multiplo con 1, 2, 3 fattori di rischio è rispettivamente 10, 5 e 1,9 anni.

Mieloma multiplo

Epidemiologia

Il MM è il tumore ematologico più frequente dopo i linfomi non-Hodgkin, rappresentando il 10% circa dei tumori ematologici e l'1,3% di tutti i tumori. In Italia, l'incidenza è stimata essere di 9 nuovi casi per 100 000 abitanti per anno, per oltre 5 900 nuovi casi nel 2018 (61). La prevalenza è in aumento dalle ultime 2 decadi per una precoce diagnosi e per la disponibilità di efficaci risorse terapeutiche che hanno allungato la sopravvivenza dei pazienti (mediana: circa 6 anni).

Eziologia e patogenesi

Fattori causativi sono sia di natura genetica, sia di tipo ambientale; quest'ultimi sono gli stessi già considerati per le MGUS, con l'aggiunta di un ulteriore fattore di rischio costituito dall'esposizione a tinture per capelli (62). Si ritiene oggi che, contrariamente a quanto postulato fino ad alcuni anni fa, il MM non derivi da una singola cellula staminale tumorale, ma che sia composto da diverse sottopopolazioni di cellule tumorali con ampia eterogeneità genetica la quale trova in parte spiegazione nei meccanismi molecolari intrinsecamente

propri delle cellule linfoidi B. Infatti, nelle cellule B secernenti, lo switch isotipico e le ipermutazioni richiedono ricombinazioni che a loro volta implicano rotture bicatinarie del DNA. Queste possono casualmente fondersi con altre fratture sparse e generare fusioni aberranti di DNA che, qualora coinvolgessero specifici oncogeni, possono conferire un vantaggio proliferativo alla cellula coinvolta. Queste fusioni anomale possono essere rilevate anche a livello cromosomico come traslocazioni. In effetti, nel MM le traslocazioni cromosomiche sono frequenti, coinvolgono spesso il cromosoma 14 (sede dei geni che codificano per la catena pesante delle immunoglobuline) e hanno significato prognostico; citiamo fra queste: t(11:14), t(4:14), t(14:16) ed altre. Oltre alle traslocazioni sono presenti fenomeni di aneuploidia (iperploidia, ipoploidia) e delezioni o guadagni di porzioni di cromosoma. Di particolare rilevanza per il suo significato prognostico avverso, la delezione del braccio corto del cromosoma 17, a livello del quale risiedono i geni che codificano la proteina p53. Le mutazioni genetiche ed epigenetiche che occorrono numerose e variegiate nel MM sono oggi considerate i parametri di maggiore rilevanza prognostica. Contribuisce alla patogenesi della malattia anche il microambiente midollare, costituito dalle cellule propriamente emopoietiche e dalle cellule endoteliali e stromali che, attraverso la secrezione di numerosi fattori, contribuiscono alla proliferazione e migrazione delle cellule mielomatose e al danno osseo. A livello fenotipico, la cellula staminale mielomatosa è ritenuta essere parte di una popolazione CD38-, CD19+, CD27+, non esprimente quindi i marcatori mielomatosi classici CD38 o CD138.

Quadro clinico

Il MM è una neoplasia di plasmacellule in differenziazione terminale ed è il punto "di arrivo" di circa il 15% delle MGUS. Inoltre, nell'80% dei MM viene prodotta una immunoglobulina monoclonale; in poco meno del 20% la CM è costituita da sole catene leggere immunoglobuliniche; nell'1-2% sono secrete proteine monoclonali in quantità minime, difficilmente rilevabili con le attuali metodiche laboratoristiche. Le manifestazioni cliniche sono dovute in parte ad attività biologiche del clone plasmacellulare (anemia, malattia ossea), in parte alla elevata produzione di proteina monoclonale sia essa una immunoglobulina intera (sindrome da iperviscosità) o, più frequentemente, una catena leggera. Quest'ultima filtra attraverso il glomerulo; quando presente in alta concentrazione supera le capacità di riassorbimento del tubulo prossimale. Ne l'accumulo nel tubulo distale ed escrezione di grandi quantità di catena leggera monoclonale (la PBJ), il legame con la proteina di Tamm-Horsfall e la precipitazione con ostruzione del tubulo stesso e conseguente insufficienza renale. Tra le manifestazioni riferibili ad altre proprietà biologiche del clone vanno annoverate l'anemia e le manifestazioni ossee. Quest'ultime sono il risultato di complesse

interazioni fra le cellule stromali midollari e le cellule mielomatose alle quali consegue uno sbilanciamento dell'equilibrio fra osteoclastogenesi (accentuata) e osteoblastogenesi (soppressa). Come risultato, si verifica un disaccoppiamento fra riassorbimento osseo e neoapposizione ossea che spiega il formarsi di osteoporosi grave e/o di osteolisi, e il dato biochimico di ipercalcemia. Nella comune pratica clinica tuttavia l'andamento del versante osseo della malattia viene seguito con tecniche di imaging (TC *low-dose*, RM nelle sue varie modalità) e il laboratorio ha un ruolo marginale, salvo che nel monitoraggio della calcemia e dei parametri di danno d'organo correlati alla ipercalcemia stessa.

Diagnosi

I criteri diagnostici sono stati recentemente rivisti e sono riportati in Tabella 3. Le manifestazioni cliniche più frequenti del MM sintomatico sono anemia, dolore osseo da fratture patologiche, infezioni o sintomi da insufficienza renale. Si sta affermando in questi ultimi anni la prassi di iniziare il trattamento quando, nel corso del monitoraggio per una MGUS o uno SMM venga evidenziato uno (o più) dei MDE, senza attendere che il paziente sviluppi sintomi o manifesti uno dei criteri CRAB. Oltre ai dati di laboratorio, la diagnosi si basa sul contenuto midollare in plasmacellule clonali e sull'imaging dei distretti ossei che poggia sulla TC *total-body low-dose* (dimostrasi più accurata delle singole radiografie dei segmenti scheletrici nel rilevare zone osteolitiche) e sulla RM che mostra i rimaneggiamenti del tessuto emopoietico midollare la cui valutazione ha mostrato valore prognostico rispetto anche al verificarsi della lesione ossea propriamente detta.

Terapia

L'indicazione alla terapia è data dal MM sintomatico (secondo i criteri CRAB) e dal verificarsi di uno o più dei MDE. L'approccio terapeutico di prima linea è ancora il trapianto di cellule staminali autologhe dopo chemioterapia con alte dosi di melphalan. La procedura richiede però una selezione dei pazienti sia in termini di età (indicativamente <70 anni) sia in termini di comorbidità pre-esistenti. I pazienti ad alto rischio citogenetico (e probabilmente anche quelli a rischio citogenetico "standard") possono beneficiare di un secondo autotrapianto (cosiddetto trapianto tandem). Possibili strategie dopo il/i trapianto/i sono il "consolidamento" e il "mantenimento", una strategia quest'ultima di lungo corso resa possibile dalla maneggevolezza dei nuovi farmaci (vedi oltre). I pazienti non candidabili alla procedura trapiantologica possono giovare di una serie di farmaci che sono stati (e continuano ad essere) messi a disposizione nelle ultime 2-3 decadi e il cui uso ha migliorato nettamente la prognosi della malattia. Si tratta dei cosiddetti *Immuno-Modulatory Drugs* (IMiDs)- (thalidomide, lenalidomide, pomalidomide), inibitori del proteasoma (bortezomib, ixazomib, carfilzomib) e di anticorpi anti CD38

(daratumumab ed altri). Di particolare interesse per il laboratorista questo ultimo che, essendo costituito da una IgG monoclonale umana, può essere rilevato alla S-EF e alla S-IF e confuso con la CM mielomatosa, rendendo problematico il monitoraggio dell'efficacia della terapia (63,64). In selezionatissimi pazienti di giovane età, è proponibile il trapianto allogenico, una procedura potenzialmente curativa ma gravata da elevata complessità, elevati costi e da significativa mortalità correlata a *graft-versus-host disease*.

Prognosi

Il MM resta una malattia per lo più incurabile, tuttavia la prognosi è sensibilmente migliorata nelle ultime due decadi; ora la mediana di sopravvivenza è pressoché raddoppiata raggiungendo globalmente i 6 anni (65). A titolo di esempio la sopravvivenza a 5 anni è aumentata rispettivamente dal 25% al 27% al 49% nei pazienti diagnosticati dal 1975-77, 1987-1989 e 2005-11 (66). Da notare che thalidomide, lenalidomide e bortezomib sono stati introdotti nei primi anni 2000. Con il prolungamento della sopravvivenza, sta emergendo un aumentato rischio di neoplasie secondarie (specialmente mielodisplasie e leucemie acute) nei pazienti che, già trattati con alchilanti (melphalan), siano stati in seguito sottoposti a prolungate terapie con lenalidomide.

Ruolo del laboratorio

Il laboratorio ha un ruolo fondamentale nel momento della diagnosi, contribuisce a formulare la prognosi ed è di vitale importanza nel monitoraggio della terapia e della definizione della qualità della risposta ematologica. La risposta ematologica completa, che è un obiettivo della terapia ed è richiesta dalla massima parte degli studi clinici, richiede la negativizzazione della S-IF e della U-IF. Per ottenere una risposta completa "stringente" è necessaria anche la normalizzazione del rFLC. Per avere una idea della rilevanza del dato laboratoristico, basti pensare a quanto complesso e indaginoso sia il monitoraggio dei pochi pazienti con MM non secernente nei quali il monitoraggio della risposta alla terapia richiederebbe esecuzioni ripetute della biopsia osteomidollare e l'imaging della situazione ossea, le cui modificazioni risultano tuttavia lente a manifestarsi.

Amiloidosi AL

Definizione ed epidemiologia

Le amiloidosi sono un gruppo di malattie nelle quali fibrille, formatesi per un anomalo *fold*ing di alcune proteine, si depositano e si accumulano in diversi organi provocandone una perdita di funzione. L'amiloidosi AL costituisce circa il 70% delle amiloidosi ed è caratterizzata dalla deposizione (in grandissima maggioranza) di sole catene leggere *misfolded*, insolubili. La deposizione può avvenire ubiquitariamente ma gli organi più frequentemente colpiti sono il cuore il rene, il sistema nervoso periferico, il fegato e il tratto gastro-intestinale e i tessuti molli. L'incidenza di questa

malattia è variabile da 6 a 10/1 000 000/anno; la prevalenza negli Stati Uniti, è di 40 casi/1 000 000 nel 2015; era di 15 nel 2007. Considerato che l'incidenza è stabile, il netto incremento della prevalenza è il risultato di lunghe sopravvivenze dovute ai successi terapeutici (67). La causa della amiloidosi AL è costantemente un clone plasmacellulare o B-linfocitario secernente e il prodotto monoclonale della secrezione è documentabile attraverso il pannello degli esami di laboratorio purché completo (S-EF, S-IF, sFLC, U-IF). Il clone midollare è usualmente modesto (plasmacellule midollari: mediana \approx 10%), a bassa cinetica proliferativa e presenta con una certa frequenza la traslocazione t(11:14) (68). Nonostante i grandi progressi negli strumenti diagnostici, l'amiloidosi AL è tuttora una malattia silente e sotto-diagnosticata o comunque diagnosticata tardivamente. I pazienti che giungono alla osservazione medica sono assai fragili e il 20% circa di essi muore entro 6 mesi dalla diagnosi, a significare che nemmeno i notevoli progressi terapeutici riescono ad avere ragione di una malattia in stadio avanzato (69).

Quadro clinico e diagnosi

Il sospetto diagnostico di amiloidosi deve essere posto in tutti i casi nei quali vengano documentati albuminuria altrimenti inspiegabile, scompenso cardiaco (prevalentemente destro) con una frazione di eiezione inizialmente conservata, neuropatia periferica demielinizante (frequente la sindrome del tunnel carpale), epatomegalia, perdita di peso e diarrea, a maggior ragione se uno di questi eventi si manifesta in un paziente con CM o comunque con una diagnosi di malattia linfoproliferativa B, secernente.

Gli organi più frequentemente coinvolti nella forma sistemica della amiloidosi AL (esiste una forma localizzata meno frequente, meno grave e che non tende a divenire sistemica) sono il cuore ed il rene. Il coinvolgimento cardiaco, prognosticamente molto rilevante, è silente e il paziente diviene sintomatico in una fase tardiva della malattia, quando l'amiloide si è depositata in abbondanza nel cuore e ne compromette sia la funzione meccanica che la stabilità elettrica. L'ecocardiogramma non presenta, se non tardivamente, elementi di sospetto e la RM cardiaca, con sensibilità diagnostica nettamente superiore, è una indagine di secondo livello e viene prescritta a conferma di un sospetto clinico già avanzato.

Il sospetto di amiloidosi va obbligatoriamente confermato su base istologica/istochimica (evidenza di deposito di materiale amorfo Rosso Congo-positivo); la natura della amiloide depositata può essere determinata con tecniche di immunoistochimica purché condotta in centri specializzati (70), immunomicroscopia elettronica (71) o, nei centri attrezzati, con metodiche di spettrometria di massa (72). La biopsia degli organi coinvolti o sospetti tali è una via da percorrere in seconda istanza, in considerazione della invasività e dei rischi della procedura. In prima istanza i prelievi biotici sono eseguiti in sedi aspecifiche quali il grasso

periombelicale o rettale o le ghiandole salivari labiali ove si può documentare la deposizione di amiloide AL, prevalentemente sistemica, con sensibilità fra il 50 e 80%. La sensibilità diagnostica della biopsia dell'organo coinvolto è di oltre il 90%. La corretta tipizzazione su tessuto è ineludibile stante la coesistenza di amiloidosi non-AL nelle quali è concomitante una CM, non correlata alla malattia.

Stratificazione del rischio

La stratificazione del rischio quanto alla sopravvivenza si basa esclusivamente su dati forniti dal laboratorio. I parametri inizialmente considerati erano quelli correlati al danno cardiaco (NTproBNP, troponine cardiache) (73), con prognosi particolarmente grave per i pazienti con valori di NTproBNP $>8\,500$ ng/L (74), successivamente implementati da parametri che stimano la massa tumorale fra i quali è risultata indipendentemente predittiva la sola differenza fra i valori della catena leggera amiloidogenica e quella non coinvolta (dFLC). Sono esitati 4 stadi in rapporto al numero (0, 1, 2, 3) dei fattori di rischio considerati (75,76) (Tabella 5). I fattori di rischio renale sono stati identificati nella proteinuria >5 g/24h (in grande prevalenza costituita da albumina) e da un eGFR <50 ml/min/1,73m²; entrambi questi parametri sono stati indipendentemente associati al rischio di dialisi (77), ma non direttamente alla sopravvivenza.

Tabella 5

Stratificazione del rischio nei pazienti con Amiloidosi AL (3 fattori di rischio, modello Mayo Clinic modificato, dai riferimenti 72-75)

Parametro	Valore soglia
NT-proBNP	1 800 ng/L
Troponina I	0,07 ng/mL
dFLC	180 mg/L

NT-proBNP, frammento aminoterminale del pro-peptide natriuretico di tipo B; dFLC, differenza tra catena leggera coinvolta e catena leggera non coinvolta

Terapia

La terapia efficace deve mirare a ridurre il più rapidamente possibile la sintesi della catena leggera amiloidogenica attraverso la soppressione del clone plasmacellulare che la produce e/o a promuovere la rimozione dei depositi di amiloide dagli organi nei quali si sono depositati. Attualmente è di ampia diffusione solo la prima delle due modalità che si avvale della chemioterapia con farmaci e schemi mutuati da quelli impiegati nel MM. In particolare la chemioterapia ad alte dosi con melphalan e trapianto di cellule staminali

autologhe è riservata ai pazienti in buon *performance status*, senza significativo coinvolgimento cardiaco [sia in termini di marcatori biochimici che di classe secondo la classificazione *New York Heart Association* (NYHA)], polmonare e epatico, ciò che limita l'accesso della maggior parte di essi a questa procedura. Negli ultimi anni, con una accurata selezione di pazienti, la mortalità trapianto-correlata è dell'1-2%. Per la grande maggioranza dei pazienti che non sono in grado di affrontare la procedura trapiantologica, ci sono svariate opzioni di chemioterapia tradizionale che includono l'associazione melphalan-desametasone e schemi comprendenti il bortezomib e gli IMiDs (thalidomide, lenalidomide). I pazienti recidivati hanno buone possibilità di rispondere nuovamente al farmaco usato in prima linea (compreso il melphalan ad alte dosi), agli IMiDs (lenalidomide e pomalidomide) e a un inibitore orale del proteasoma (ixazomib). L'anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD38 daratumumab, ha dimostrato un'elevata efficacia anche usato da solo. Come sottolineato poco sopra, questo farmaco può dare adito a qualche difficoltà di interpretazione del tracciato elettroforetico (molto meno frequentemente rispetto a quando viene usato nella terapia del MM) in quanto il picco monoclonale del farmaco può essere confuso con la CM originale del paziente.

Ruolo del laboratorio

Il dato di laboratorio è fondamentale in fase di screening. Uno screening efficace in grado di far emergere una clonalità a sola catena leggera (in oltre 2/3 dei casi di tipo lambda) richiede che vengano eseguite oltre alla S-EF, la S-IF, la determinazione delle sFLC sul siero e la U-IF per raggiungere la massima sensibilità e non perdere nemmeno un paziente (13). La misura di NT-proBNP, della albuminuria e l'aumento isolato della fosfatasi alcalina possono rafforzare rispettivamente il sospetto di un coinvolgimento cardiaco, renale e epatico prima che vi siano segni clinici del danno d'organo. In particolare la determinazione di NT-proBNP è accreditata di una sensibilità del 100% nel rilevare un interessamento cardiaco da amiloidosi AL. Una proteinuria (albuminuria in questo caso) non spiegata, con funzione renale ancora conservata è un altro dato che deve far porre il sospetto di interessamento renale. Molto importante ai fini di una diagnosi precoce la misura delle sFLC: un alterato rFLC è stato costantemente documentato fino a 4 anni prima dello sviluppo di amiloidosi (29). Questo parametro quindi deve far parte delle indagini all'interno del monitoraggio di tutti i pazienti con un processo linfoproliferativo/plasmacellulare secernente, anche asintomatico; in caso di rFLC alterato, il monitoraggio deve comprendere anche la determinazione di NT-proBNP, della albuminuria e della fosfatasi alcalina. Ciò permette di identificare, allo stato pre-sintomatico, quasi tutti i pazienti con amiloidosi (78): la diagnosi e la terapia a questo stadio permettono oggi risultati soddisfacenti (73). L'efficacia della terapia è desunta dalla rapida riduzione della concentrazione

sierica della catena leggera amilodogenica e dei biomarcatori di coinvolgimento cardiaco (NT-proBNP), renale (proteinuria, eGFR) ed epatico (fosfatasi alcalina). Parimenti, il monitoraggio di questi biomarcatori può essere la prima spia della recidiva, anche se non è stato raggiunto un consenso su quale sia il *timing* più appropriato per re-intervenire dal punto di vista terapeutico.

Light chain deposition disease

Definizione e quadro clinico

La LCDD è la più frequente delle MIDD, definizione che include il deposito non fibrillare in vari organi e tessuti e che risale al 1999 (79). Nella LCDD il deposito delle catene leggere è Rosso Congo negativo e al microscopio elettronico appare finemente granulare o filamentoso (80). Il deposito si rinviene principalmente a carico delle membrane basali del tubulo renale benché siano stati segnalati coinvolgimenti a carico del cuore, dei polmoni, del sistema nervoso centrale (SNC), del fegato e del tratto gastro-intestinale e dei muscoli. Il quadro renale non è omogeneo dal punto di vista morfologico, immunologico ed ultrastrutturale; conseguentemente il quadro clinico può presentare qualche variazione, ma è caratterizzato da microematuria, proteinuria in range nefrosico con PBJ e ipertensione arteriosa. Sono possibili casi con proteinuria modesta o assente (81), ciò che rende difficile il riconoscimento della malattia. La LCDD, se non curata efficacemente, porta ad insufficienza renale terminale che obbliga alla dialisi o al trapianto di rene (82). Fra le manifestazioni extrarenali, quelle cardiache sono le più frequenti, con frequenza tanto maggiore (fino ad almeno il 30%) quanto maggiormente sono rappresentati i pazienti che, dal punto di vista ematologico, sono inquadrabili come MM (cioè con plasmacellule clonali midollari $\geq 10\%$) (83). Le manifestazioni cardiache hanno caratteristiche cliniche, ecocardiografiche e biomorali largamente sovrapponibili alle analoghe manifestazioni della cardiopatia amiloidotica (84). Il coinvolgimento polmonare è più raro e si può manifestare in forma diffusa, nodulare o cistica con incerta evoluzione fra queste due ultime forme (85,86). La prognosi delle manifestazioni polmonari è variabile; vi sono decorsi indolenti negli anni (prevalentemente le forme nodulari) e decorsi rapidamente progressivi (forme diffuse/cistiche) che richiedono il trapianto del polmone. Ancora più raro il coinvolgimento del SNC (87), del fegato (88) e dei muscoli (89).

Ruolo del laboratorio

Nella LCDD le criticità iniziano prima della diagnosi: è più spesso coinvolta la catena leggera kappa che tende ad aggregarsi e che è riconoscibile con difficoltà alla S-EF e persino alla S-IF, cosicché in oltre il 60% dei pazienti con LCDD la CM può non venire rilevata (90). Fondamentale quindi anche la determinazione delle

sFLC oltre che l'accurata misura delle proteine urinarie e della PBJ. Il monitoraggio si avvale, oltre che della misura delle sFLC, anche dei parametri biumorali di danno del rene (eGFR, creatinina sierica, proteinuria), del cuore (NT-proBNP, troponine cardiache) e del fegato (fosfatasi alcalina, gammaglutamil transpeptidasi).

Sindrome POEMS

Definizione e patogenesi

La sindrome POEMS è molto rara, probabilmente paraneoplastica ed è sostenuta da un clone plasmacellulare. Oltre alla polineuropatia, obbligatoria per la diagnosi, possono far parte della sindrome altre variabili manifestazioni, risultandone quadri clinici alquanto pleomorfi. La sindrome riconosce una causa ematologica ma la sua patogenesi è piuttosto oscura. Si ritiene che le manifestazioni cliniche siano in gran parte attribuibili alle elevate concentrazioni del *Vascular Endothelial Growth Factor* sierico (sVEGF) (91-93), benché i valori di sVEGF non rispecchino sempre il decorso della malattia (94,95) e siano stati descritti alcuni casi di sindrome POEMS con valori normali o solo lievemente alterati di sVEGF (96,97). Altre citochine come interleukina (IL)-12 (98), IL-6, *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α) (99), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) e *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (100) sembrano up-regolate nella sindrome POEMS e possono contribuire al quadro clinico. In particolare, i livelli di IL-6 sono predominanti nei casi di sindrome POEMS associata a malattia di Castleman (93). Le plasmacellule, sia monoclonali che policlonali, sia midollari (101,102) che linfonodali (malattia Castleman) (103) sono ritenute la fonte principale delle concentrazioni elevate del sVEGF come di altre citochine. Non è attualmente chiaro come questo network citochimico disregolato possa indurre le modificazioni degli organi coinvolti e determinare il quadro clinico.

Quadro clinico-patologico

Quadro ematologico. Il midollo emopoietico ha in genere un modestissimo infiltrato plasmacellulare clonale (mediana ≈5%), per il 90% di tipo lambda; in una minoranza di pazienti le plasmacellule non mostrano clonalità. Nel 50% dei pazienti, le plasmacellule sono disposte attorno ad aggregati linfoidi, una caratteristica unica fra tutte le malattie plasmacellulari. Vi è spesso una iperplasia megacariocitaria. Il 30% circa dei pazienti mostra un modesto ingrandimento linfonodale che istologicamente ha le caratteristiche della malattia di Castleman, sia nella sua variante ialino-vascolare che multicentrica (104-106). I pazienti con questa variante, nei quali non sia dimostrabile il clone plasmacellulare midollare né che abbiano la neuropatia sono riferiti come affetti da *Castleman disease variant of the POEMS syndrome* (107,108).

Polineuropatia. È una manifestazione obbligata per la diagnosi e spesso costituisce il sintomo d'esordio. Essa

è solitamente di tipo sensitivo-motoria, simmetrica, demielinizzante, ad esordio acuto/subacuto, con disturbi sensitivi e astenia distale rapidamente progressiva che conduce precocemente il paziente alla sedia a rotelle. Frequente il dolore neuropatico (55-76%). Nonostante la disponibilità di criteri diagnostici, incluso un marcatore sensibile e relativamente specifico come il sVEGF, diagnosi errate e tardive sono ancora molto frequenti (60% circa) e la neuropatia della sindrome POEMS viene frequentemente confusa con una Polineuropatia Infiammatoria Demielinizzante Cronica (CDIP) (109).

Organomegalia ed endocrinopatia. Una quota variabile dei pazienti (25-75%) mostra splenomegalia e/o epatomegalia e/o adenopatie. La biopsia linfonodale mostra un quadro di malattia di Castleman, per lo più di tipo ialino-vascolare; poco è noto sulla istopatologia di fegato e milza. Circa l'85% dei pazienti mostra endocrinopatie multiple, la più frequente delle quali è l'ipogonadismo. La maggior parte di queste disfunzioni persiste ancora dopo remissioni ematologiche anche di lunga durata (osservazione personale).

Componente monoclonale e quadro osseo. La dimostrazione di un clone (anche piccolo) plasmacellulare è, con la neuropatia, obbligatoria per la diagnosi; tuttavia è possibile riscontrare la CM sierica (IgG o IgA - raramente IgM - ma pressoché sempre lambda), solo nell'85% dei pazienti (110). La CM del siero è di lieve entità (mediana 1 g/L); le sFLC sono aumentate nella maggioranza dei pazienti ma il rFLC è per lo più normale (111). In meno della metà dei pazienti è documentata una PBJ seppure in quantità minima (mediana ≤100 mg/24h) (108). Le concentrazioni della CM non seguono in parallelo quelle del sVEGF e non rispecchiano, se non grossolanamente, il decorso della malattia (91). Le manifestazioni cliniche, laboratoristiche e istologiche del clone plasmacellulare possono essere così elusive che è talvolta necessario ricorrere alla più sensibili tecniche immunoistochimiche su campioni di osso osteosclerotico e laboratoristiche (S-IF e U-IF) per svelarlo. Il coinvolgimento osseo avviene nel 95% dei casi, è multiplo ma, a differenza del MM, le lesioni ossee sono sclerotiche o miste litico-sclerotiche. La TC *whole body* è ritenuta oggi la metodica più appropriata nella valutazione della malattia ossea (112), più accurata della ¹⁸F-FDG [fluoro-2-deossio-2-D-glucosio] PET/CT che non è sufficientemente sensibile nei pazienti con sole lesioni ossee sclerotiche (113).

Skin changes. Anche il coinvolgimento cutaneo è assai eterogeneo e include iperpigmentazione, acrocianosi, ipertricosi, ispessimento e *clubbing* delle unghie oltre alla comparsa di emangiomi multipli (114-116).

Altre manifestazioni. Oltre il 60% dei pazienti che necessitano di un controllo oculistico riferisce visione offuscata, diplopia e il 50% circa di essi ha papilledema (111,117). C'è poi un peculiare sovraccarico di volume extravascolare che si manifesta con edemi periferici e versamenti cavitari. Nella maggioranza dei casi i versamenti hanno caratteristiche essudative (92,111). Sono possibili manifestazioni respiratorie inclusi versamenti pleurici. Completano il quadro una diatesi trombofilica a carico dei distretti sia venoso sia arterioso che si può

manifestare sotto forma di ictus, infarti del miocardio e dell'intestino e di sindrome di Budd-Chiari, un coinvolgimento renale (cl clinicamente non preminente) ed un ispessimento delle pachimeningi (anch'esso usualmente asintomatico) (118).

Cenni di terapia

La terapia è diretta in prima istanza ad eradicare il clone e si avvale dei farmaci usati nelle altre malattie plasmacellulari, inclusa la lenalidomide (119). Anche il bortezomib, nonostante gli iniziali timori per la neurotossicità ad esso correlata, può essere usato con vantaggio (120). La rarità della sindrome POEMS impedisce tuttavia che si siano consolidati dei chiari indirizzi terapeutici. Oltre alle procedure chemioterapiche, incluso l'autotrapianto di midollo, ha un ruolo ben definito anche la radioterapia delle lesioni ossee, purché limitate come numero e come estensione e nel contesto di una malattia limitata. La malattia ha un andamento cronico e i pazienti cui è stata diagnosticata negli ultimi 15 anni mostrano tassi di sopravvivenza dell'80% circa a 10 anni.

Ruolo del laboratorio

Al laboratorio spetta innanzitutto di rilevare una CM che può essere di entità così lieve da non poter essere diagnosticata senza una sensibile S-IF. Corroborata il sospetto diagnostico la determinazione di sVEGF; un ruolo ancillare ha la misura di vari marcatori endocrini (ormone tireostimolante, prolattina, testosterone, ormone adrenocorticotropo). Nel monitoraggio, più che la quantificazione della/e CM sieriche /urinarie che possono non rispecchiare fedelmente l'andamento della malattia, sono più rappresentative misure seriate di sVEGF che, pur in presenza delle attuali difficoltà metodologiche, forniscono assieme a più complesse indagini strumentali (elettromiografia, PET-CT, scintigrafia ossea, TC *low-dose*) informazioni sul decorso della sindrome. L'integrazione dei dati laboratoristici, strumentali e clinici richiede comunque cautela ed esperienza. Il coinvolgimento di organi endocrini non regredisce significativamente neppure dopo prolungate remissioni ematologiche, perciò valutazione ormonali seriate sono di scarso aiuto.

Componenti monoclonali IgM e malattie correlate

Definizione e epidemiologia

Le CM IgM possono sottendere una ampia gamma di malattie che hanno manifestazioni cliniche pleomorfe e per lo più differenti da quelle correlate a gammopatie non-IgM. Le GM IgM costituiscono il 3-5% di tutte le GM negli afro-americani e negli asiatici (21,121,122) ed il 15% circa nei caucasici (21,31). La frequenza relativa delle malattie potenzialmente sottese da CM IgM, almeno in pazienti asiatici vede in ordine decrescente le IgM-MGUS (42%), la WM (28%), altri linfomi non-Hodgkin (18%), la amiloidosi AL IgM-correlata (4%).

Sono inoltre possibili la malattia da agglutinine a frigore (4%), la crioglobulinemia (1,6%), le neuropatie periferiche IgM-correlate. Più rari il MM IgM e la sindrome POEMS. Il laboratorio ha un ruolo insostituibile nella diagnosi, nella diagnosi differenziale, nella prognosi e nel monitoraggio della terapia in tutte queste situazioni.

Nel 2003 il Secondo International Workshop sulla WM definì la malattia una condizione caratterizzata da infiltrazione midollare da parte di un linfoma linfoplasmocitoide, qualunque sia la concentrazione della IgM sierica; al contrario, ogni altra CM IgM senza o con incerta infiltrazione midollare veniva definita IgM-MGUS in assenza di sintomi o *IgM-related disease* in caso di sintomi o manifestazioni pertinenti (vedi sopra) (123). Successivamente ed in analogia con quanto stabilito per il MM, venne introdotta la categoria della *Smoldering Waldenstrom's Macroglobulinemia* (SWM) definita da una CM IgM ≥ 30 g/L e/o da una infiltrazione midollare linfoplasmacellulare $\geq 10\%$, in assenza di manifestazioni cliniche e di sintomi direttamente correlati al linfoma quali sintomi costituzionali, organomegalie, citopenie, sindrome da iperviscosità (124).

Gammopatia monoclonale di incerto significato di tipo IgM (IgM-MGUS)

Patogenesi. La IgM-MGUS implica un rischio annuo medio del 2% circa di progressione verso la WM o, meno frequentemente, verso altri linfomi non-Hodgkin quali la leucemia linfatica cronica; complessivamente il rischio evolutivo è circa il 10% a 5 anni e il 18% a 10 anni. Uno dei possibili motivi di questo elevato rischio evolutivo ci viene fornito dagli studi di genetica molecolare. È stato dimostrato come nella WM ricorra con frequenza elevata una mutazione somatica del gene *MYD88* che codifica una proteina facente parte del *signalling del Toll-Like Receptor* (TLR), coinvolto nella risposta innata a patogeni e nella risposta immune antigene-specifica. La mutazione consiste nella sostituzione leucina-prolina nella posizione 265 della sequenza aminoacidica (L265P) e dà origine a una proteina mutata con importante ruolo patogenetico nello sviluppo di linfomi non-Hodgkin B, inclusa la WM. Tale mutazione è presente nel 90% circa delle WM (125,126); successivamente essa è stata dimostrata anche nel 50-80% dei pazienti con IgM-MGUS (127,128). Questi dati dimostrano che la mutazione L265P è coinvolta già precocemente nella patogenesi molecolare della WM piuttosto che nella successiva trasformazione da IgM-MGUS a WM. Nella WM è frequente anche la mutazione del gene *CXCR4* che implica una attivazione costitutiva della cascata di *CXCR4* e di altre vie metaboliche con il risultato finale di favorire la sopravvivenza delle cellule linfomatose della WM. Le mutazioni somatiche di *CXCR4* si trovano nel 30% circa dei pazienti con WM (e nel 20% circa delle IgM-MGUS), sembrano avvenire in tempi successivi alla mutazione di *MYD88* e conferiscono un andamento clinico aggressivo e resistenza ad Ibrutinib (129-131). È stato riportato come la mutazione *MYD88* costituisca un fattore di

rischio per evoluzione da IgM-MGUS a WM, assieme ad altri semplici dati di laboratorio quali una CM ≥ 15 g/L e un anomalo rFLC (132) o più complessi dati immunofenotipici (133).

Smoldering Waldenstrom's Macroglobulinemia

In questa situazione il rischio evolutivo a WM è assai maggiore rispetto al rischio delle IgM-MGUS attestandosi al 12% annuo per i primi 5 anni e al 2% annuo per i successivi 5 anni. Sono considerati fattori di rischio evolutivo la concentrazione della IgM sierica, l'anemia e la quota dell'infiltrazione linfoplasmacellulare midollare (134). A 5 anni dalla diagnosi evolve a WM franca rispettivamente il 92% e il 46% dei pazienti con infiltrazione midollare $>50\%$ e $<50\%$ (135). Anche la mutazione *MYD88* sembra essere un ulteriore fattore di rischio evolutivo (136).

Macroglobulinemia di Waldenström (WM)

Definizione ed epidemiologia. Per la definizione di WM sono richieste due condizioni: una inequivocabile dimostrazione morfologica ed immunofenotipica di infiltrazione midollare (almeno il 10%) da parte di un linfoma linfoplasmocitoide e una CM sierica IgM da esso prodotta, di qualsiasi entità (123). Dal punto di vista biologico, oltre alle già citate mutazioni rilevabili a livello molecolare, sono documentabili anche alterazioni citogenetiche, quali delezione di 6q (nel 42% dei pazienti), di 11q e la trisomia 4, tutte con significato prognostico sfavorevole. Si tratta di una malattia rara, ad andamento cronico, spesso scoperta occasionalmente in età prevalentemente avanzate. L'incidenza è di 3,8/1 000 000, stabile negli ultimi decenni (dati USA) (137), nettamente maggiore negli uomini. Le manifestazioni obiettive sono poco eclatanti e consistono in epatomegalia, splenomegalia e linfadenomegalia (rispettivamente nel 20% e 15% dei casi).

Quadro clinico. Fra i sintomi di esordio prevale l'astenia da anemia da infiltrazione midollare; più rari i sintomi correlati all'azione della CM IgM, quali sindrome da iperviscosità (che si estrinseca in prevalenza in una subdola sindrome emorragica), sintomi neurologici (quest'ultimi correlabili anche all'azione anticorpale della IgM monoclonale) e anemia emolitica. Come per il MM e l'amiloidosi, in virtualmente tutti i pazienti la WM è preceduta da una IgM-MGUS. Vi sono alcune difficoltà nella gestione clinico-laboratoristica dei pazienti con WM, sia alla diagnosi sia durante il trattamento. Fra queste segnaliamo la difficoltà nella misurazione della CM IgM legata alla possibilità che questa immunoglobulina ha di precipitare a temperature inferiori a quella corporea (crioglobulinemia), la erratica relazione fra IgM sierica e infiltrato plasmacellulare, la possibilità di un significativo e talvolta pericoloso aumento della IgM sierica dopo le fasi iniziali di trattamento con Rituximab (il cosiddetto *flare*). Il profilo immunofenotipico delle cellule neoplastiche consente la diagnosi differenziale nei confronti della leucemia linfatica cronica e del linfoma della zona marginale, malattie linfoproliferative talvolta accompagnate da una CM IgM,

così come la valutazione della mutazione *MYD88* raramente presente in queste due malattie ed assente nei rarissimi casi di MM IgM.

Prognosi. La WM è una malattia attualmente non guaribile, ha un decorso indolente ed una sopravvivenza mediana fra 7 e 10 anni, notevolmente migliorata negli ultimi anni. Sono stati individuati alcuni parametri (età >65 anni, emoglobina ≤ 115 g/L, piastrine $\leq 100 \times 10^9/L$, β_2 microglobulina >3 mg/L, IgM >70 g/L) che permettono la stratificazione del rischio usata negli studi clinici ma non ancora validata per le strategie terapeutiche correnti (14). La terapia è richiesta dalla presenza di segni e/o sintomi della malattia, più che dalla concentrazione della CM IgM in quanto tale. La valutazione della risposta alla terapia si avvale, oltre che delle modifiche dei segni e dei sintomi, della riduzione della concentrazione della CM sierica.

Cenni di terapia. Non vi sono algoritmi standardizzati per l'approccio terapeutico. I due schemi di polichemioterapia più usati in prima linea consistono nelle associazioni desametasone + rituximab + ciclofosfamide e bendamustina + rituximab. Altri approcci, usati per lo più in malattia recidivante/refrattaria consistono nello schema R-CHOP (rituximab-ciclofosfamide doxorubicina vincristina prednisone), nelle associazioni comprendenti bortezomib, negli analoghi dei nucleosidi (fludarabina e cladribina) e nell'ibrutinib, un inibitore della Bruton-Kinase (138).

Ruolo del laboratorio. La identificazione e la quantificazione della CM IgM sierica rivestono un ruolo primario nella diagnosi e nel monitoraggio e richiedono particolare cura da parte del laboratorio e cautela da parte del clinico poiché si possono incontrare difficoltà nella sua misura sia su gel di agarosio, sia in elettroforesi capillare (139,140). Inoltre il laboratorio è chiamato a identificare il titolo delle IgM anti *Myelin-Associated Glycoprotein* (anti-MAG) in caso di neuropatia e di misurare la viscosimetria. Il laboratorio indirizzerà l'attribuzione di un eventuale quadro emorragico alla sindrome da iperviscosità o al deficit di piastrine e/o di altri fattori della coagulazione.

IgM-Related disorders

Con questo termine, coniato nel 2003, si intendono quadri clinici attribuibili alla CM IgM in assenza di dimostrazione morfologica di linfoma (123). La CM IgM può avere effetti patogeni in quanto tale, cioè in virtù delle sue proprietà chimico-fisiche come nella sindrome da iperviscosità e nella crioglobulinemia tipo I o perché possiede proprietà anticorpali (è cioè un anticorpo di classe IgM) come nelle neuropatie, nella crioglobulinemia di tipo II e nella *Cold-Agglutinin Disease* (CAD).

Sindrome da iperviscosità. L'eccesso di macroproteine (specie delle IgM) produce un sovraccarico emodinamico e, soprattutto, interferisce con la cascata coagulativa fino a provocare manifestazioni emorragiche potenzialmente catastrofiche, come emorragie del SNC. Tali manifestazioni richiedono urgenti misure terapeutiche, in prima istanza la plasmaferesi. La sindrome da ipervisco-

sità si verifica per il 90% nella WM quale conseguenza diretta delle elevate concentrazioni delle IgM, ma è in corso di MM per elevate concentrazioni di IgG o IgA. Non vi è un rapporto lineare fra concentrazioni delle immunoglobuline monoclonali e frequenza della sindrome da iperviscosità, benché questo evento si verifichi in genere a partire da concentrazioni di IgM monoclonale >30 g/L. Come tale, la sindrome si presenta nel 5-10% nei pazienti con WM di nuova diagnosi. La manifestazione clinica più frequente è una sindrome emorragica subdola (epistassi, facili sanguinamenti muco-cutanei, ematuria) non giustificata dai parametri emocoagulativi e dal conteggio piastrinico; si associano spesso sintomi neurologici quali cefalea, visione offuscata, diplopia, acufeni e vertigini. Benché sia disponibile una valutazione diretta della viscosità sia plasmatica che ematica, è necessario, in presenza di sintomi e di concentrazioni di IgM specie se elevate, sospettare la sindrome e procedere con urgenza alla plasmaferesi terapeutica anche in assenza del dato della viscosimetria. L'*International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia* raccomanda per ogni paziente con CM >30 g/L il controllo del *Fundus Oculi* che può mostrare alterazioni prodromiche della sindrome (141).

Polineuropatie. Si stima che il 10% circa di tutte le neuropatie "idiopatiche" sia correlato a GM; per converso una neuropatia coesiste nel 30-50% dei pazienti con GM IgM/WM. Il 50% delle CM IgM ha intrinseche proprietà anticorpali anti-MAG cioè contro una glicoproteina della guaina mielinica del nervi cranici e periferici (142). La reattività IgM anti-MAG era valutata tramite tecniche di Western blot; più recentemente è possibile rilevare le concentrazioni sieriche di detti anticorpi mediante un test ELISA che si esprime in Bühlmann Titer Unit (BTU) (143). I pazienti con neuropatia IgM-associata che hanno un quadro clinico (neuropatia demielinizzante sensitiva distale), elettrofisiologico e morfologico considerato caratteristico (60% circa) hanno un elevato titolo di IgM anti-MAG (>8 000 – 10 000 BTU); nei rimanenti pazienti con quadri diversi, la IgM ha un basso titolo anti-MAG e può reagire contro altri antigeni sulfatidici o gangliosidici della mielina (144). In ogni caso la manifestazione neuropatica, quando clinicamente significativa, richiede il trattamento quale che sia il quadro clinico complessivo: se la neuropatia si verifica nel contesto di una WM franca, sarà necessaria la chemioterapia di combinazione (vedi sopra); se la neuropatia è associata ad una IgM-MGUS, condizione che di per sé non richiede provvedimenti ematologici, si può usare con buona efficacia il solo Rituximab.

Crioglobulinemie. Si tratta di un complesso di quadri clinici causati da immunoglobuline che hanno la proprietà di precipitare in vitro a temperature inferiori a 37°C e di ridisciogliersi al ritorno a 37°C. CM IgM sono pressoché sempre parte in causa nelle crioglobulinemie sia di tipo I (costituite esclusivamente dalla CM IgM, più raramente da IgG o IgA ma sempre monoclonali), sia nelle crioglobulinemie di tipo II (miste) nelle quali le IgM monoclonali hanno attività di fattore reumatoide con specificità anticorpali anti IgG policlonali autoctone legandole e for-

mando immunocomplessi. Le crioglobuline di tipo III sono costituite da IgM policlonali con attività di fattore reumatoide verso IgG anch'esse policlonali e si riscontrano in prevalenza in malattie reumatologiche o infettive. Le manifestazioni cliniche sono in parte sovrapponibili: nelle crioglobulinemie di tipo I, i sintomi sono correlati a occlusioni vascolari dovute al crioprecipitato e prevalgono in sede cutanea acrale o in sede renale. In sede cutanea il quadro consiste in porpora, acrocianosi, fenomeni di Raynaud e ulcere torpide e avviene perché nella cute, specie acrale, è più frequente raggiungere una temperatura <37°C. In sede renale il quadro consiste in una glomerulonefrite che si manifesta con ematuria, proteinuria ed ipertensione arteriosa e si realizza in virtù di più elevate concentrazioni delle crioglobuline quali conseguenza della ultrafiltrazione. In entrambi i casi, i fenomeni infiammatori (vasculitici) sono minimi o assenti. È nelle crioglobulinemie di tipo I che si raggiungono le più elevate concentrazioni di crioglobuline: quando ciò si verifica le IgM con proprietà di crioprecipitare possono contribuire al verificarsi della sindrome da iperviscosità. Dal punto di vista ematologico la crioglobulinemia di tipo I avviene nel contesto di una MGUS (IgM-MGUS per lo più) (40% circa); nel 60% circa il contesto ematologico è quello di una malattia linfoproliferativa franca (WM o MM). Le crioglobulinemie di tipo II sono correlate per il 90% ad HCV. In questi casi è il complesso IgM monoclonale anti-IgG a precipitare ed interagire con le cellule endoteliali e in quella sede si viene ad attivare la cascata del complemento realizzandosi così fenomeni vasculitici che sono potenzialmente più pericolosi, a dispetto del fatto che la concentrazione delle crioglobuline sia in genere assai inferiore a quanto rilevato nelle crioglobulinemie di tipo I. In queste circostanze la componente monoclonale IgM è di entità minima e la biopsia midollare evidenzia un infiltrato linfomatoso anch'esso minimo o non evidenzia alcunché. Il quadro clinico è pleomorfo ed include porpora, artralgie, astenia e febbre. Oltre al rene possono essere coinvolti anche il SNC, il tratto gastrointestinale e il polmone. Il coinvolgimento di questi apparati comporta una prognosi severissima.

Il laboratorio svolge un ruolo essenziale nella gestione di questa condizione. Per sostanziare il sospetto clinico di crioglobulinemia è necessario dimostrare il crioprecipitato e, quando evidenziato, occorre che sul crioprecipitato venga condotta l'immunofissazione, indagine necessaria a distinguere il tipo di crioglobulinemia. L'entità del crioprecipitato non correla con le manifestazioni cliniche. Fondamentale la misura della frazione C4 del complemento che può essere considerato un buon marcatore di attività del processo: in fase di attività della crioglobulinemia di tipo II è frequente una riduzione della concentrazione sierica di C4 per effetto del suo consumo nelle sedi di attività della malattia. In caso di sospetta crioglobulinemia è inoltre necessario tenere il campione prelevato e condurre la S-EF a 37°C poiché l'eventuale precipitazione della crioglobulina può condurre a sottostima della componente monoclonale IgM e della viscosità del siero (145-147).

Malattia da agglutinine a frigore. La CAD costituisce il 15% circa di tutte le anemie emolitiche. Si tratta di una anemia emolitica autoimmune prevalentemente extravascolare nella quale l'emolisi è innescata da un autoanticorpo, per lo più di tipo IgM, capace di fissarsi alle emazie a temperature di 4°C o superiori ed agglutarle (agglutinina). Alla base di questa malattia si può rilevare, nell'80% dei casi, una identica malattia linfoproliferativa B, differente sia dal linfoma linfoplasmocitoidale che dal linfoma della zona marginale, mentre nel restante 20% non è possibile documentare alcun processo linfoproliferativo. Anche nei pazienti con evidenza di processo linfoproliferativo, l'infiltrazione linfoide del midollo emopoietico è risultata sempre modesta e a localizzazione intertrabecolare (148). La maggior parte delle agglutinine a frigore ha specificità anti-I, antigene presente in tutti i soggetti a partire dai 18 mesi di età. Il raffreddamento del sangue che si produce nel suo passaggio attraverso le parti acrali permette il legame della agglutinina e l'agglutinazione. Tanto maggiore è l'ampiezza termica dell'agglutinina (cioè la più alta temperatura alla quale l'agglutinina è in grado di legarsi all'antigene) tanto maggiore sarà l'agglutinazione e la successiva fissazione del complemento e la generazione di C3b che permane sulla superficie eritrocitaria dopo che il riscaldamento del sangue avrà provocato il distacco della agglutinina. Le emazie così opsonizzate vengono sequestrate dai macrofagi prevalentemente in sede epatica (emolisi extravascolare). L'attivazione della cascata complementare può proseguire a generare la frazione C5 del complemento che è responsabile di una quota parte (di solito minima) di emolisi intravascolare (147,149). Quindi i fenomeni di agglutinazione e di emolisi sono dipendenti più dall'ampiezza termica dell'agglutinina che dalla sua concentrazione.

Relativamente alla gestione del paziente, è fondamentale ridurre l'esposizione al freddo. L'approccio terapeutico comprende rituximab, da solo o in combinazione con fludarabina o bendamustina ed altro ancora. Sono incoraggianti i primi dati di impiego di modulatori dell'attività complementare.

Anche in questo caso il laboratorio svolge un ruolo essenziale. Il quadro più frequente è quello di una anemia emolitica cronica, con riduzione dei valori di emoglobina, riduzione di aptoglobina, reticolocitosi e iperbilirubinemia (modesta) indiretta. In caso si sospetti una CAD, oltre alle indagini morfologiche e immunoistochimiche/citofluorimetriche su biopsia di midollo, sono necessarie S-EF e S-IF, e misura delle immunoglobuline. Fondamentale il test di Coombs diretto che dimostrerà frazioni di C3d (e, più raramente anche IgG) (150) e l'agglutinina a frigore con titolo >64 (questo test va condotto a 4°C). Non è necessario stabilire l'ampiezza termica dell'agglutinina se non in rari casi. Per tutti questi esami è necessario mantenere il campione di sangue a temperature di almeno 37°C fino a che il siero non sia stato rimosso dal coagulo. Stabilita la diagnosi, il monitoraggio di laboratorio si avvale della valutazione dei parametri di emolisi come emoglobina,

conteggio e indici reticolocitari, aptoglobinemia, bilirubinemia oltre che sulla misurazione della CM IgM.

CONCLUSIONI

Negli ultimi 2 decenni si è verificato un significativo progresso nella definizione dei quadri linfoproliferativi/plasmacellulari che hanno come epifenomeno un processo di secrezione di immunoglobuline e/o di loro frammenti. Il progresso è stato reso possibile dalle conoscenze scaturite dalla genetica molecolare, dalla citogenetica classica, dalla immunoistochimica e dalla biologia molecolare su tessuto biotico e dalla enucleazione e standardizzazione di criteri diagnostici e fattori di rischio di pertinenza del laboratorio. Tutto ciò ha permesso di individuare molti quadri morbosi ai quali le gammopatie sono patogeneticamente associate, di restringere sempre di più le GM di "significato indeterminato" (17), di formulare diagnosi e monitoraggi più accurati e terapie mirate con risultati talvolta spettacolari sulla prognosi dei pazienti.

In tutti i quadri clinici qui delineati, la gestione del paziente non può prescindere dai dati che il laboratorio clinico è in grado di fornire; anzi in molte circostanze i marcatori biochimici sono da soli in grado di orientare le decisioni cliniche.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Graziani M, Dolci A, Greco C, et al. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi proteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
2. Dolci A, Vernocchi A. Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-9.
3. Caldini A, Graziani M, Basile U, et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
4. Milani P, Murray DL, Barnidge DR, et al. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol* 2017;92:772-9.
5. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2001;25:23-32.
6. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:338-46.
7. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:126-32.
8. 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.
9. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673-80.
10. 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.
11. Kumar S, Dispenzieri A, Katzmann JA, et al. Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood* 2010;116:5126-9.
 12. Caladini A, Graziani M. La determinazione delle catene leggere libere nel siero può sostituire la ricerca e quantificazione della proteinuria di Bence Jones nella pratica clinica? *Biochim Clin* 2013;37:405-18.
 13. Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem* 2009;55:499-504.
 14. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* 2014;15:e538-e48.
 15. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012;30:4541-9.
 16. Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, et al. Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood* 2012;120:4292-5.
 17. Feraud JP, Bridoux F, Dispenzieri A, et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications. *Blood* 2018;132:1478-85.
 18. Landgren O, Graubard BI, Kumar S, et al. Prevalence of myeloma precursor state monoclonal gammopathy of undetermined significance in 12372 individuals 10–49 years old: a population-based study from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Blood Cancer J* 2017;7:e618.
 19. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* 2010;375:1721-8.
 20. Cohen HJ, Crawford J, Rao MK, et al. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *Am J Med* 1998;104:439-44.
 21. Landgren O, Graubard BI, Katzmann JA, et al. Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: a population-based study of 12,482 persons from the National Health and Nutritional Examination Survey. *Leukemia* 2014;28:1537-42.
 22. Iwanaga M, Tomonaga M. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance in Asia: a viewpoint from nagasaki atomic bomb survivors. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14:18-20.
 23. Vernocchi A, Longhi E, Lippi G, et al. Increased Monoclonal Components: prevalence in an Italian population of 44 474 outpatients detected by capillary electrophoresis. *J Med Biochem* 2016;35:50-4.
 24. Therneau TM, Kyle RA, Melton LJ, et al. Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition. *Mayo Clin Proc* 2012;87:1071-9.
 25. Vachon CM, Kyle RA, Therneau TM, et al. Increased risk of monoclonal gammopathy in first-degree relatives of patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2009;114:785-90.
 26. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-7.
 27. Weiss BM, Abadie J, Verma P, et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113:5418-22.
 28. Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2015;125:2370-80.
 29. Weiss BM, Hebreo J, Cordaro DV, et al. Increased serum free light chains precede the presentation of immunoglobulin light chain amyloidosis. *J Clin Oncol* 2014;32:2699-704.
 30. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346:564-9.
 31. Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood* 2014;123:338-45.
 32. Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, et al. Relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and radiation exposure in Nagasaki atomic bomb survivors. *Blood* 2009;113:1639-50.
 33. Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, et al. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood* 2009;113:6386-91.
 34. Kirkeleit J, Riise T, Bratveit M, et al. Increased risk of acute myelogenous leukemia and multiple myeloma in a historical cohort of upstream petroleum workers exposed to crude oil. *Cancer Causes Control* 2008;19:13-23.
 35. Goldstein BD. Benzene as a cause of lymphoproliferative disorders. *Chem Biol Interact* 2010;184:147-50.
 36. Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of benzene. *Lancet Oncol* 2017;18:1574-5.
 37. Mitus AJ, Stein R, Rapoport JM, et al. Monoclonal and oligoclonal gammopathy after bone marrow transplantation. *Blood* 1989;74:2764-8.
 38. Baldini L, Guffanti A, Cesana BM, et al. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood* 1996;87:912-8.
 39. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002;20:1625-34.
 40. Rosinol L, Cibeira MT, Montoto S, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc* 2007;82:428-34.
 41. Fahey JL, Sell S. The Immunoglobulins of Mice. V. The Metabolic (Catabolic) Properties of Five Immunoglobulin Classes. *J Exp Med* 1965;122:41-58.
 42. Kyle RA, Bieger RC, Gleich GJ. Diagnosis of syndromes associated with hyperglobulinemia. *Med Clin North Am* 1970;54:917-38.
 43. Varettoni M, Corso A, Cocito F, et al. Changing pattern of presentation in monoclonal gammopathy of undetermined significance: a single-center experience with 1400 patients. *Medicine (Baltimore)* 2010;89:211-6.
 44. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005;106:812-7.
 45. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal

- gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
46. Kastritis E, Terpos E, Mouloupoulos L, et al. Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia* 2013;27:947-53.
 47. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, et al. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 2013;27:941-6.
 48. Kastritis E, Mouloupoulos LA, Terpos E, et al. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28:2402-3.
 49. Katzmann JA, Willrich MA, Kohlhagen MC, et al. Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays. *Clin Chem* 2015;61:360-7.
 50. Bianchi G, Kyle RA, Colby CL, et al. Impact of optimal follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance on early diagnosis and prevention of myeloma-related complications. *Blood* 2010;116:2019-25; quiz 197.
 51. Sigurdardottir EE, Turesson I, Lund SH, et al. The role of diagnosis and clinical follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance on survival in multiple myeloma. *JAMA Oncol* 2015;1:168-74.
 52. Go RS, Gundrum JD, Neuner JM. Determining the clinical significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a SEER-Medicare population analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15:177-86.
 53. Leung N, Bridoux F, Batuman V, et al. The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. *Nat Rev Nephrol* 2019;15:45-59.
 54. Ravindran A, Go RS, Fervenza FC, et al. Thrombotic microangiopathy associated with monoclonal gammopathy. *Kidney Int* 2017;91:691-8.
 55. Vos JM, Gustine J, Rennke HG, et al. Renal disease related to Waldenstrom macroglobulinaemia: incidence, pathology and clinical outcomes. *Br J Haematol* 2016;175:623-30.
 56. Paueksakon P, Revelo MP, Horn RG, et al. Monoclonal gammopathy: significance and possible causality in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:87-95.
 57. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:2582-90.
 58. Mateos MV, San Miguel JF. Treatment for high-risk smoldering myeloma. *N Engl J Med* 2013;369:1764-5.
 59. Ahn IE, Mailankody S, Korde N, et al. Dilemmas in treating smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2015;33:115-23.
 60. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008;111:785-9.
 61. AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2018. Rapporto AIOM / AIRTUM 2018. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/08/20180927RM_01_Gori.pdf. (ultimo accesso: Settembre 2019)
 62. Altekruse SF, Henley SJ, Thun MJ. Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study (United States). *Cancer Causes Control* 1999;10:617-25.
 63. Willrich MA, Ladwig PM, Andreguetto BD, et al. Monoclonal antibody therapeutics as potential interferences on protein electrophoresis and immunofixation. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1085-93.
 64. van de Donk NW, Otten HG, El Haddad O, et al. Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex assay (DIRA). *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1105-9.
 65. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111:2516-20.
 66. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30.
 67. Quock TP, Yan T, Chang E, et al. Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Adv* 2018;2:1046-53.
 68. Perfetti V, Palladini G, Merlini G. Immune mechanisms of AL amyloidosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004;1.
 69. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis diagnosis and treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J* 2018;8:44.
 70. Schonland SO, Hegenbart U, Bochtler T, et al. Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood* 2012;119:488-93.
 71. Fernandez de Larrea C, Verga L, Morbini P, et al. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. *Blood* 2015;125:2239-44.
 72. Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *The Lancet* 2016;387:2641-54.
 73. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004;22:3751-7.
 74. Wechalekar AD, Schonland SO, Kastritis E, et al. A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood* 2013;121:3420-7.
 75. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol* 2012;30:989-95.
 76. Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:38.
 77. Palladini G, Hegenbart U, Milani P, et al. A staging system for renal outcome and early markers of renal response to chemotherapy in AL amyloidosis. *Blood* 2014;124:2325-32.
 78. Merlini G, Wechalekar AD, Palladini G. Systemic light chain amyloidosis: an update for treating physicians. *Blood* 2013;121:5124-30.
 79. Buxbaum J, Gallo G. Nonamyloidotic monoclonal immunoglobulin deposition disease. Light-chain, heavy-chain, and light- and heavy-chain deposition diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999;13:1235-48.
 80. Gokden N, El Jamal S, Gokden M, et al. Renal sclerosing peritubular nodules in a patient with neurofibromatosis type 2: a case report with immunohistochemical and electron microscopic studies. *Hum Pathol* 2009;40:1650-4.
 81. Sicard A, Karras A, Goujon JM, et al. Light chain deposition disease without glomerular proteinuria: a diagnostic challenge for the nephrologist. *Nephrol Dial*

- Transplant 2014;29:1894-902.
82. Sayed RH, Wechalekar AD, Gilbertson JA, et al. Natural history and outcome of light chain deposition disease. *Blood* 2015;126:2805-10.
 83. Mohan M, Buros A, Mathur P, et al. Clinical characteristics and prognostic factors in multiple myeloma patients with light chain deposition disease. *Am J Hematol* 2017;92:739-45.
 84. De Lazzari M, Fedrigo M, Migliore F, et al. Nonamyloidotic Light Chain Cardiomyopathy: The Arrhythmogenic Magnetic Resonance Pattern. *Circulation* 2016;133:1421-3.
 85. Sheard S, Nicholson AG, Edmunds L, et al. Pulmonary light-chain deposition disease: CT and pathology findings in nine patients. *Clin Radiol* 2015;70:515-22.
 86. Colombat M, Stern M, Groussard O, et al. Pulmonary cystic disorder related to light chain deposition disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:777-80.
 87. Grainger BT, Issa S, Anderson NE. Primary idiopathic CNS non-amyloidogenic light chain deposition disease complicated by treatment-resistant focal seizure disorder. *J Clin Neurosci* 2019;59:313-5.
 88. Cristino A, Pais C, Silva R, et al. Light-Chain Deposition Disease with prominent hepatic involvement. *Eur J Case Rep Intern Med* 2017;4:000545.
 89. Ostrow LW, Corse AM, Morrison BM, et al. Expanding the spectrum of monoclonal light chain deposition disease in muscle. *Muscle Nerve* 2012;45:755-61.
 90. Nasr SH, Valeri AM, Cornell LD, et al. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: a report of 64 patients from a single institution. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:231-9.
 91. Watanabe O, Maruyama I, Arimura K, et al. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is causative in Crow-Fukase (POEMS) syndrome. *Muscle Nerve* 1998;21:1390-7.
 92. Cui RT, Yu SY, Huang XS, et al. Incidence and risk factors of pleural effusions in patients with POEMS syndrome. *Hematol Oncol* 2015;33:80-4.
 93. Scarlato M, Previtali SC, Carpo M, et al. Polyneuropathy in POEMS syndrome: role of angiogenic factors in the pathogenesis. *Brain* 2005;128:1911-20.
 94. Kuwabara S, Kanai K, Misawa S, et al. Relapse of POEMS syndrome without increased level of VEGF. *Neuromuscul Disord* 2009;19:740.
 95. Imai N, Taguchi J, Yagi N, et al. Relapse of polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M-protein, and skin changes (POEMS) syndrome without increased level of vascular endothelial growth factor following successful autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Neuromuscul Disord* 2009;19:363-5.
 96. Pulivarthi S, Gurram MK. An atypical presentation of POEMS syndrome with IgG kappa type M protein and normal VEGF level: Case report and review of literature. *J Cancer Res Ther* 2018;14:679-81.
 97. Misawa S, Sato Y, Katayama K, et al. Vascular endothelial growth factor as a predictive marker for POEMS syndrome treatment response: retrospective cohort study. *BMJ Open* 2015;5:e009157.
 98. Kanai K, Sawai S, Sogawa K, et al. Markedly upregulated serum interleukin-12 as a novel biomarker in POEMS syndrome. *Neurology* 2012;79:575-82.
 99. Nakayama-Ichihama S, Yokote T, Hirata Y, et al. Multiple cytokine-producing plasmablastic solitary plasmacytoma of bone with polyneuropathy, organomegaly, endocrinology, monoclonal protein, and skin changes syndrome. *J Clin Oncol* 2012;30:e91-4.
 100. Yamada Y, Sawai S, Misawa S, et al. Multiple angiogenic factors are upregulated in POEMS syndrome. *Ann Hematol* 2013;92:245-8.
 101. Wang C, Huang XF, Cai QQ, et al. Remarkable expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow plasma cells of patients with POEMS syndrome. *Leuk Res* 2016;50:78-84.
 102. Nakajima H, Ishida S, Furutama D, et al. Expression of vascular endothelial growth factor by plasma cells in the sclerotic bone lesion of a patient with POEMS syndrome. *J Neurol* 2007;254:531-3.
 103. Nishi J, Arimura K, Utsunomiya A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in sera and lymph nodes of the plasma cell type of Castleman's disease. *Br J Haematol* 1999;104:482-5.
 104. Nakanishi T, Sobue I, Toyokura Y, et al. The Crow-Fukase syndrome: a study of 102 cases in Japan. *Neurology* 1984;34:712-20.
 105. Soubrier MJ, Dubost JJ, Sauvezie BJ. POEMS syndrome: a study of 25 cases and a review of the literature. French Study Group on POEMS Syndrome. *Am J Med* 1994;97:543-53.
 106. Li J, Zhou DB, Huang Z, et al. Clinical characteristics and long-term outcome of patients with POEMS syndrome in China. *Ann Hematol* 2011;90:819-26.
 107. Warsame R, Yanamandra U, Kapoor P. POEMS Syndrome: an Enigma. *Curr Hematol Malig Rep* 2017;12:85-95.
 108. Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2017 Update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2017;92:814-29.
 109. Nasu S, Misawa S, Sekiguchi Y, et al. Different neurological and physiological profiles in POEMS syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:476-9.
 110. Dispenzieri A, Kyle RA, Lacy MQ, et al. POEMS syndrome: definitions and long-term outcome. *Blood* 2003;101:2496-506.
 111. Cui RT, Yu SY, Huang XS, et al. The characteristics of ascites in patients with POEMS syndrome. *Ann Hematol* 2013;92:1661-4.
 112. Glazebrook K, Guerra Bonilla FL, Johnson A, et al. Computed tomography assessment of bone lesions in patients with POEMS syndrome. *Eur Radiol* 2015;25:497-504.
 113. Pan Q, Li J, Li F, Zhou D, Zhu Z. Characterizing POEMS Syndrome with 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2015;56:1334-7.
 114. Iwashita H, Ohnishi A, Asada M, et al. Polyneuropathy, skin hyperpigmentation, edema, and hypertrichosis in localized osteosclerotic myeloma. *Neurology* 1977;27:675-81.
 115. Chan JK, Fletcher CD, Hicklin GA, et al. Glomeruloid hemangioma. A distinctive cutaneous lesion of multicentric Castleman's disease associated with POEMS syndrome. *Am J Surg Pathol* 1990;14:1036-46.
 116. Barete S, Mouawad R, Choquet S, et al. Skin manifestations and vascular endothelial growth factor levels in POEMS syndrome: impact of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Arch Dermatol* 2010;146:615-23.
 117. Cui R, Yu S, Huang X, et al. Papilloedema is an independent prognostic factor for POEMS syndrome. *J Neurol* 2014;261:60-5.
 118. Briani C, Fedrigo M, Manara R, et al. Pachymeningeal involvement in POEMS syndrome: MRI and histopathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*

- 2012;83:33-7.
119. Nozza A, Terenghi F, Gallia F, et al. Lenalidomide and dexamethasone in patients with POEMS syndrome: results of a prospective, open-label trial. *Br J Haematol* 2017;179:748-55.
 120. Riva M, Lessi F, Berno T, et al. Bortezomib-based regimens in patients with POEMS syndrome: a case series in newly diagnosed and relapsed patients. *Leuk Lymphoma* 2019;60:2067-70.
 121. Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: study of 52,802 persons in Nagasaki City, Japan. *Mayo Clin Proc* 2007;82:1474-9.
 122. Cao XX, Meng Q, Mao YY, et al. The clinical spectrum of IgM monoclonal gammopathy: A single center retrospective study of 377 patients. *Leuk Res* 2016;46:85-8.
 123. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:110-5.
 124. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
 125. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115-9.
 126. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012;367:826-33.
 127. Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 2013;121:2051-8.
 128. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood* 2013;121:2522-8.
 129. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood* 2014;123:4120-31.
 130. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, et al. The WHIM-like CXCR4(S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2015;29:169-76.
 131. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, et al. Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine* 2015;372:1430-40.
 132. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2018;378:241-9.
 133. Paiva B, Montes MC, Garcia-Sanz R, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenstrom's clone in IgM-MGUS and Waldenstrom's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia* 2014;28:166-73.
 134. Kyle RA, Dispenzieri A, Kumar S, et al. IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering Waldenstrom's macroglobulinemia (SWM). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11:74-6.
 135. Kyle RA, Benson JT, Larson DR, et al. Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: long-term results. *Blood* 2012;119:4462-6.
 136. Correa JG, Cibeira MT, Tovar N, et al. Prevalence and prognosis implication of MYD88 L265P mutation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2017;179:849-51.
 137. Kyle RA, Larson DR, McPhail ED, et al. Fifty-Year Incidence of Waldenström Macroglobulinemia in Olmsted County, Minnesota, From 1961 Through 2010: A Population-Based Study With Complete Case Capture and Hematopathologic Review. *Mayo Clin Proc* 2018;93:739-46.
 138. Leblond V, Kastritis E, Advani R, et al. Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Blood* 2016;128:1321-8.
 139. Keren DF, Gulbranson R, Carey JL, et al. 2-Mercaptoethanol treatment improves measurement of an IgMkappa M-protein by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2001;47:1326-7.
 140. Schild C, Egger F, Kaelin-Lang A, et al. Monoclonal gammopathy missed by capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1217-9.
 141. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenstrom Macroglobulinaemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenstrom Macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2016;175:77-86.
 142. Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, et al. Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol* 1994;36:416-24.
 143. Caudie C, Bouhour F, Petiot P, et al. Diagnostic value of the anti-IgM SGPG Elisa (Buhlmann laboratories AG) in 147 sera with a monoclonal IgM anti-MAG/SGPG antibody-associated neuropathy. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007;65:369-75.
 144. Nobile-Orazio E, Gallia F, Terenghi F, et al. How useful are anti-neural IgM antibodies in the diagnosis of chronic immune-mediated neuropathies? *J Neurol Sci* 2008;266:156-63.
 145. Sargur R, White P, Egner W. Cryoglobulin evaluation: best practice? *Ann Clin Biochem* 2010;47:8-16.
 146. Passerini G, Basile U. Recommendations for a protocol to detect, quantify and characterize cryoglobulins. *Biochim Clin* 2010;34:218-22.
 147. Muchtar E, Magen H, Gertz MA. How I treat cryoglobulinemia. *Blood* 2017;129:289-98.
 148. Randen U, Troen G, Tierens A, et al. Primary cold agglutinin-associated lymphoproliferative disease: a B-cell lymphoma of the bone marrow distinct from lymphoplasmacytic lymphoma. *Haematologica* 2014;99:497-504.
 149. Berentsen S. Cold agglutinin disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2016:226-31.
 150. Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R, et al. Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica* 2006;91:460-6.

Variabilità biologica dei parametri dell'esame emocromocitometrico in soggetti sani

Michela Seghezzi¹, Sabrina Buoro¹, Barbara Manenti¹, Paola Dominoni¹, Ferruccio Ceriotti², Cosimo Ottomano³, Giuseppe Lippi⁴, Anna Carobene⁵

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

²Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

³Synlab, Castenedolo, Italy

⁴Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italy

⁵Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

ABSTRACT

Biological variation estimates of complete blood count parameters in healthy subjects.

Background: the complete blood count (CBC) is the test more frequently requested in clinical practice. Therefore, estimating the biological variation (BV) of CBC parameters is essential for assessing the analytical performance of hematological analyzers and for enabling accurate data interpretation and appropriate clinical management. This study was aimed to define BV estimates and reference change value (RCV) of CBC parameters.

Methods: the study population consisted of 21 healthy volunteers, who had BV of CBC parameters assessed with Sysmex XN. The study protocol, the analytical measurements and the statistical analysis were carried out according to current recommendations of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM).

Results: Within-subject BV ranged between 0,3% for mean cell hemoglobin (MCH) and 19,7% for immature granulocytes (IG), whilst between-subjects BVs ranged between 0,9% for mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) and 66,6% for microcytic red blood cells (Micro-R). The RCV ranged between 2,3% for MCH and 73,5% for IG.

Conclusion: This study has allowed the estimation of BV of many CBC parameters, some of which have not been currently explored, thus leading the way to use RCV calculated according to time of monitoring and/or differentiated by sex.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di nuove tecnologie e di principi analitici nel campo della citometria a flusso, ha permesso di sviluppare analizzatori ematologici di ultima generazione con migliori prestazioni, con nuovi parametri emocitometrici quantitativi e qualitativi, utili per la caratterizzazione delle cellule del sangue periferico (1-6). Questi emocitometri producono determinazioni quantitative sempre più accurate e precise (come ad esempio conta cellulare e valutazione degli indici cellulari) e qualitative sensibili e specifiche (come allarmi morfologici in diagrammi di dispersione delle popolazioni cellulari), entrambi utili a discriminare con alta sensibilità e specificità il campione patologico dal normale (1,6).

Nonostante il miglioramento delle tecnologie, sono

oggi disponibili pochi studi aggiornati sulla variabilità biologica (VB), sia per i parametri di base dell'esame emocromocitometrico che per i nuovi parametri aggiuntivi, requisito indispensabile al fine di stabilirne le specifiche di qualità analitica (APS) per l'interpretazione clinica dei risultati (7). I dati di VB sono infatti fondamentali per la corretta interpretazione clinica dei parametri ematologici, specialmente per quelli di più recente introduzione.

In generale i parametri dell'esame emocromocitometrico, con rare eccezioni (ad esempio per il volume corpuscolare medio delle emazie), sono soggetti a grande variabilità legata alla cinetica cellulare, al sesso, all'età, allo stress, al fumo e all'alimentazione (7,8). I dati ottenuti dall'analisi della VB sono essenziali per calcolare la differenza critica (DC), particolarmente

Corrispondenza a: Sabrina Buoro, UOC SMel 2 Analisi Chimico Cliniche, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS, 1-24127 Bergamo

Ricevuto: 18.01.2019

Revisionato: 05.03.2019

Accettato: 21.03.2019

Publicato on-line: 10.06.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.031

utile per i parametri caratterizzati da un basso indice di individualità (II) (7), per i quali piccole variazioni nel monitoraggio dei pazienti rischiano di essere trascurate perché comprese nell'intervallo di riferimento, ma significative perché superiori alla DC (9). L'attuale database online di VB ospitato nel sito di Westgard, aggiornato al 2014 (10), non contiene informazioni relative a molti parametri ematologici di recente introduzione ed attualmente inseriti nei referti. Molti valori di questo database sono inoltre stati generati con emocitometri non più disponibili in commercio e utilizzando protocolli poco standardizzati per selezione e dimensione del campione, età dei soggetti coinvolti, stagionalità e tempistica di sviluppo dello studio (7, 11-13).

Lo scopo del lavoro è presentare la determinazione e la stima della VB, del II e della DC dei principali parametri refertabili dell'esame emocromocitometrico (11-13). Il protocollo dello studio, le misure di laboratorio e l'elaborazione statistica, sono state definite e sviluppate in accordo con le indicazioni del Gruppo di lavoro sulla Variabilità Biologica di EFLM (14-16).

METODI

Protocollo di studio

Il protocollo di studio è conforme a quanto riportato in precedenza (11-13).

La popolazione iniziale è costituita da 25 volontari adulti, presumibilmente sani (14 donne e 11 uomini; età ≥ 18 anni), reclutati tra il personale del laboratorio dell'Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo, a cui è stato sottoposto un modulo per il consenso informato al fine del reclutamento. Il protocollo è stato descritto a tutti i volontari, che sono stati sottoposti anche ad una valutazione clinica per l'idoneità allo studio. A ogni volontario è stato fornito un questionario per raccogliere informazioni relative alla propria storia clinica, all'uso corrente o passato di farmaci e allo stile di vita, che includeva:

- dati personali (data di nascita, sesso, origine etnica, indice di massa corporea);
- stile di vita (fumatore/non fumatore, assunzione di alcool, donazioni di sangue, attività fisica);
- condizioni cliniche (eventuali malattie in corso come diabete, malattie croniche, tumori, insufficienza renale, disordini infiammatori acuti o cronici, assunzione di farmaci includendo anticoncezionali orali, supplementi nutrizionali);
- storia familiare per malattie neoplastiche, ematologiche, cardiovascolari, renali, epatiche, mentali, e endocrinologiche;
- qualsiasi altra condizione o malattia clinicamente significativa.

Tutti i soggetti durante l'arruolamento sono stati identificati con un codice univoco, e quindi sottoposti ad un prelievo di sangue per i seguenti esami: emocromo con formula e conteggio dei reticolociti (RET) su sangue, glucosio, creatinina, colesterolo totale, trigliceridi,

alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, proteina C reattiva, ferritina, proteine totali e indici del siero (emolisi, ittero e lipemia/torbidità) su campione di siero.

I criteri di esclusione erano: non avere fornito le informazioni complete richieste nel questionario, essere fumatore anche occasionale, avere assunto alcool >10 g/die, avere effettuato donazione di sangue nei tre mesi precedenti allo studio, la presenza di malattie in forma acuta o cronica, l'assunzione recente di ogni tipo di farmaco o supplementi nutrizionali, non avere i valori degli esami di laboratorio previsti dal protocollo all'interno degli intervalli di riferimento, sia al momento dell'arruolamento, che nei successivi momenti così come previsto dal progetto.

Durante tutta la durata dello studio, ai partecipanti è stato raccomandato di evitare eccessivo esercizio fisico, mantenere una dieta regolare, rispettare digiuno notturno prima dei prelievi, nonché astenersi dall'assunzione di alcool l'intero giorno precedente al prelievo.

Ad ogni prelievo veniva effettuata una nuova visita medica e aggiornata la storia clinica. Sono state registrate le seguenti informazioni: data e ora della raccolta del campione, ora dell'analisi del campione, concomitanza con il ciclo mestruale, stato di digiuno, assunzione di alcool nelle ultime 48 ore, eventuali cambiamenti significativi dello stato di salute, dieta, attività fisica, assunzione di farmaci, contraccettivi orali, supplementi vitaminici.

I prelievi dei campioni di sangue intero sono stati eseguiti per cinque settimane consecutive, lo stesso giorno della settimana (mercoledì), al mattino, tra le 8:00 e le 8:30, dallo stesso prelevatore esperto, sempre dallo stesso braccio, mediante prelievo venoso (VACUETTE®, Greiner bio-one, Kremsmunster, Austria).

Il campione di sangue intero per l'emocromo è stato raccolto in provette contenenti K_3 EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), mentre il campione di sangue per gli esami di chimica clinica è stato raccolto in provette con gel separatore senza additivi (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Prima del prelievo tutti i soggetti sono rimasti seduti per almeno cinque minuti.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Papa Giovanni XXIII ed è stato eseguito in accordo con la Dichiarazione di Helsinki, secondo la legislazione locale.

Analisi di laboratorio

L'emocromo completo, compreso il conteggio dei RET, è sempre stato eseguito sul sistema Sysmex XN-9000 (Sysmex Co., Kobe, Giappone), costituito da cinque emocitometri: 2 moduli XN della serie blu e 3 moduli XN della serie verde. Il modulo XN blu, oltre ai canali per l'analisi di base come il conteggio dei leucociti, delle emazie, delle piastrine e i relativi indici, la determinazione dell'emoglobina e della formula leucocitaria, è anche dotato di applicazioni per il

conteggio dei RET, dei precursori leucocitari (*white precursors cell*, WPC) e delle piastrine (PLT) con metodo ottico in fluorescenza (6).

I parametri forniti da XN blu utilizzati in questo articolo sono di seguito riportati (1, 6):

- eritrocitari: emoglobina (Hb), conteggio delle emazie (RBC), ematocrito (Ht), volume corpuscolare eritrocitario medio (MCV), contenuto medio di emoglobina (MCH), contenuto medio percentuale di emoglobina (MCHC) delle emazie, ampiezza della curva di distribuzione delle emazie (RDW-CV ed RDW-SD) e percentuale di emazie microcitiche (Micro-R);
- reticolocitari: conteggio RET, frazione immatura reticolocitaria (IRF) e contenuto medio emoglobinico reticolocitario (RET-He);
- leucocitari: conteggio dei leucociti (WBC), dei neutrofilii (NE), dei linfociti (LY), dei monociti (MO) degli eosinofili (EO) dei basofili (BA) e dei granulociti immaturi (IG);
- piastrinici: conteggio delle PLT, volume piastrinico medio (MPV), piastrinocrito (PCT), percentuale di grandi piastrine (P-LCR), ampiezza della curva di distribuzione delle piastrine (PDW).

Per l'analisi delle popolazioni cellulari questo analizzatore utilizza un sistema di citometria a flusso combinato con il metodo ottico a fluorescenza e quello impedenziometrico. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato entro 1 ora dal prelievo, usando sempre lo stesso modulo XN blu e lo stesso lotto di reagenti. Durante tutto il periodo dello studio, la qualità dei risultati è stata certificata da controllo di qualità interno, utilizzando tre livelli di un materiale di controllo dedicato (XN-CHECK livelli 1, 2 e 3; Streck Laboratories Inc., Omaha, NE, USA).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con il metodo CV-ANOVA sui risultati che sono stati precedentemente trasformati in CV e quindi normalizzati (17). Prima dell'analisi dei dati è stata effettuata l'analisi dei dati aberranti a tre livelli: tra replicati, nel soggetto e tra soggetti. L'omogeneità dell'imprecisione analitica (tra replicati) e l'omogeneità delle varianze intra-individuali (CV_I) sono state verificate rispettivamente con i test di Bartlett (18) e Cochran (19). Il test di Shapiro-Wilk (20) è stato usato per verificare la normalità dei residui, mentre col criterio di Dixon (21) sono stati individuati eventuali aberranti tra i valori medi dei soggetti.

La verifica dello stato stazionario dell'intera popolazione è stata condotta, per ogni misurando, con una regressione lineare sui valori mediani dell'intero gruppo per la durata dello studio. I soggetti sono stati considerati in stato stazionario se il 95% dell'intervallo di confidenza (95%IC) della pendenza della retta includeva lo zero. Cambiamenti sistematici individuali sono identificati dal test di omogeneità delle varianze intra individuali (test di Cochran).

I risultati ottenuti nei soggetti di sesso maschile sono

stati originariamente elaborati separatamente da quelli ottenuti nelle femmine per tutti i misurandi. La significatività delle differenze tra i due sottogruppi è stata valutata, sia per valori medi di concentrazione, sia per CV_I , sia per la interindividuale (CV_G), dalla sovrapposizione degli 95%IC.

Sono stati inoltre calcolati i seguenti parametri:

- indice di individualità (II) (CV_I / CV_G) (7);
- differenza critica (DC) $[(2,77 \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{0.5})]$ (7); (dove per CV_A si intendono i coefficienti di variabilità analitica);
- numero di campioni necessario per la stima (con il 95% di probabilità) del punto omeostatico individuale, all'interno di un intervallo del $\pm 10\%$ $[(1,96 \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{0.5}/D)^2]$ (dove $D = 10$) (7);

Le stime di VB sono state utilizzate per calcolare le APS per l'imprecisione (CV_{APS}), il bias (B_{APS}) e per l'errore totale (ET_{APS}), a diversi livelli di qualità (minimo, desiderabile, ottimale).

Per ottenere le APS desiderabili sono stati applicati i seguenti criteri:

$$CV_{APS} = \frac{1}{2} CV_I (7);$$

$$B_{APS} = [0,25 * (CV_I^2 + CV_G^2)^{0.5}] (7);$$

$$ET_{APS} = [CV_{APS} * 1,65 + B_{APS}] (7);$$

L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando Excel 2010 ed Analyse-it (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK).

RISULTATI

Le caratteristiche della popolazione sono riassunte nella Tabella 1. Prima di iniziare la raccolta dei campioni per lo studio, quattro soggetti sono stati esclusi in base ai criteri succitati. La VB è stata quindi calcolata in 21 soggetti (12 donne e 9 uomini; età media di 42 e di 53 anni rispettivamente; di origine caucasica); con un totale di 105 misurazioni in doppio (Tabella 1). I test di Barlett (che valuta l'omogeneità dell'imprecisione analitica, tra i replicati) e di Cochran (che valuta il CV_I) hanno identificato un aberrante per i parametri NE e P-LCR, quattro aberranti per il parametro IG, un aberrante per i parametri MCH, RDW-CV, RET e Micro-R, due aberranti per il parametro EO. Un aberrante è stato identificato per i parametri Micro-R, WBC, IG, PLT e PCT usando il criterio di Dixon. La CV_G di quest'ultimi parametri è stata quindi calcolata utilizzando i dati ottenuti da 20 soggetti (11 femmine e 9 maschi), anziché 21.

Il test di Shapiro-Wilk, ha mostrato una distribuzione normale dei valori medi di tutti i parametri ad eccezione di LY, per il quale è stata quindi necessaria la trasformazione logaritmica.

L'analisi statistica non ha rivelato differenze di genere per parametri leucocitari e piastrinici (95%IC sono sovrapponibili), mentre ha evidenziato una differenza per i parametri RBC, Hb, Ht, MCV, MCHC, per i quali è stata quindi necessaria l'analisi dei dati differenziata tra sessi. Tutti i risultati di CV_A , CV_I , CV_G sono riassunti in Tabella 2.

I risultati sono stati suddivisi per genere solo per i parametri che hanno differenze significative, quindi

Tabella 1*Caratteristiche della popolazione studiata.*

Soggetti inclusi nello studio	Numero di soggetti	Età media (ambito)	Media dell'indice di massa corporea (ambito)
Maschi	9	53 (45 - 64)	24,5 (20,2 - 30,0)
Femmine	12	42 (26 - 54)	22,1 (18,5 - 25,2)
Tutti i soggetti	21	47 (26 - 64)	23,0 (18,5 - 30,0)

senza sovrapposizione dei 95%IC.

La variabilità analitica (CV_A), varia da 0,2% a 9,8% per i parametri eritrocitari e reticolocitari, da 1,5% a 17,8% per i parametri leucocitari e da 1,1% a 3,1% per i parametri piastrinici. La CV_I varia da 0,3% a 16,4% per i parametri eritrocitari e reticolocitari, da 11,0% a 19,7% per i parametri leucocitari, da 2,3% a 7,2% per i parametri piastrinici. CV_I di RBC e Hb mostrano una differenza statisticamente significativa tra generi. La CV_G è compresa tra 0,9% e 32,8% per i parametri eritrocitari e reticolocitari, tra 15,0% e 33,9% per i parametri leucocitari, tra 7,2% e 20,7% per i parametri piastrinici.

La DC varia da 2,3% per MCH a 73,5% per il conteggio dei IG. Le APS sono descritte in Tabella 3. CV_{APS} varia da 0,1% per MCH a 9,9% per il conteggio dei IG. B_{APS} varia da 0,3% per il parametro MCHC a 16,9% per il parametro Micro-R. Infine TE_{APS} varia da 0,9% per il parametro MCHC a 28,7% per il parametro EO. L'II è sempre <0,6 per tutti i parametri considerati ad eccezione di MCHC, WBC, NE, MO, IG. Il numero di campioni necessari per stabilire il punto omeostatico individuale è sempre minore del numero di campioni prelevati ($n=5$) per tutti i parametri considerati (dati omessi) (11-13).

DISCUSSIONE

Nel corso degli anni sono emersi vari limiti dei dati di VB disponibili in letteratura e riportati nel database online di Westgard (10), dovuti all'impiego di metodi ormai obsoleti per le determinazioni analitiche, a protocolli e a criteri di selezione della popolazione non conformi alle raccomandazioni, al disegno dello studio con frequenza di prelievi e tempo complessivo non adeguata e, infine, alla elaborazione statistica non del tutto appropriata (22).

Per questa ragione, EFLM ha promosso due importanti progetti. Il primo, attraverso la creazione di un Task Group (TG) sul database di VB, che si propone di valutare tutta la bibliografia pubblicata fino ad ora riguardo alla VB, in accordo con i criteri definiti nella lista di controllo della valutazione critica (BIVAC) (16). Questo percorso porterà alla definizione di un nuovo database della EFLM, con nuove stime di VB ottenute tramite meta-analisi dei dati "pesati" in funzione del livello di qualità con cui sono stati ottenuti (7, 16).

Il secondo progetto, ideato dal gruppo di lavoro sulla

VB della EFLM, ha l'obiettivo di aggiornare i dati di VB per il maggior numero di misurandi possibile, attraverso un progetto europeo (*European Biological Variation Study*, EuBIVAS) su scala multicentrica (23-27), sviluppato in accordo ai criteri EFLM (14,16). Le nuove stime di VB ottenute da EuBIVAS e pubblicate fino ad ora, risultano essere inferiori a quelle presenti nel data base di Westgard, e di potenza statistica superiore (23-27).

Considerando che per l'esame emocromocitometrico è necessario un campione di sangue intero, il gruppo di lavoro della EFLM ha disegnato un progetto su scala nazionale in accordo al protocollo EuBIVAS, per determinare nuove stime di VB in campo ematologico (28), lavoro che però non ha valutato molti dei parametri di ultima generazione, come ad esempio IRF, PCT, IG, PDW, Micro-R.

Questi parametri possono contribuire ad aumentare la sensibilità e la specificità dell'esame emocromocitometrico, già di per sé caratterizzato da risposte rapide e poco costose, importanti in molte situazioni di urgenza/emergenza.

I dati di VB sono un elemento fondamentale non solo per la determinazione dei traguardi analitici e per il monitoraggio delle prestazioni dell'analizzatore, ma anche per consentire un'accurata interpretazione dei dati ed una appropriata gestione clinica dei risultati. In particolare, per i parametri di nuova introduzione le conoscenze sui possibili risvolti clinici sono limitate; di conseguenza, disporre di criteri oggettivi come la DC per la valutazione del risultato, permette di valutarne la reale efficacia nella pratica clinica (7).

I dati di questo articolo sono il frutto di uno studio svolto in accordo con le indicazioni EFLM (14,16), che ha permesso di confermare i dati di BV dei parametri di base dell'esame emocromocitometrico pubblicati dal gruppo di lavoro EFLM (28) e di definire i dati di VB per i parametri emocromocitometrici strumento-specifici (IRF, RET-He, IG, indici eritrocitari e piastrinici), determinati sia per periodo di campionamento a breve termine (cinque giorni; dati omessi), sia per un periodo di campionamento a medio termine (cinque settimane) (11-13).

In generale il potere statistico dello studio (11-13) è robusto. Il rapporto CV_A/CV_I è sempre <1,0 come suggerito da Røraas e al. (29), ad eccezione del parametro MCHC che è esattamente 1,0.

Tabella 2

Variabilità biologica (VB), coefficienti di variabilità analitica, (CV_A) intraindividuale (CV_I) e interindividuale (CV_G) dei parametri dell'esame emocromocitometrico. Tabella modificata ed integrata dai riferimenti 11, 12, 13.

Parametri		N° soggetti	Media (95%IC)	CV _A % (95%IC)	CV _I % (95%IC)	CV _G % (95%IC)
RBC (10 ¹² /L)	tutti	21	4,87 (4,80-4,94)	0,6 (0,6-0,7)	1,8 (1,5-2,1)	9,1 (6,9-13,1)
	maschi	9	5,16§ (5,07-5,25)	0,6 (0,5-0,8)	1,4§ (1,1-1,9)	7,8 (5,2-14,9)
	femmine	12	4,64 (4,57-4,71)	0,7 (0,6-0,8)	2,4 (1,9-3,0)	7,1 (5,0-12,1)
Hb (g/L)	tutti	21	143 (142-145)	0,5 (0,5-0,6)	2,0 (1,7-2,4)	8,2 (6,3-11,9)
	maschi	9	151§ (149-153)	0,4 (0,4-0,6)	1,3§ (1,1-1,7)	6,3 (4,2-12,1)
	femmine	12	137 (135-139)	0,6 (0,9-0,8)	2,3 (1,9-2,9)	6,8 (4,8-11,7)
Ht (L/L)	tutti	21	0,42 (0,42-0,43)	0,6 (0,5-0,7)	2,4 (2,1-2,9)	7,4 (5,6-10,7)
	maschi	9	0,44§ (0,44-0,45)	0,6 (0,5-0,7)	2,2 (1,8-2,9)	5,7 (3,8-11,1)
	femmine	12	0,41 (0,40-0,41)	0,6 (0,5-0,8)	2,6 (2,1-3,2)	6,2 (4,3-10,7)
MCV (fL)	tutti	21	86,7 (86,2-87,2)	0,2 (0,2-0,2)	0,9 (0,8-1,1)	3,9 (3,0 - 5,6)
	maschi	9	85,6§ (84,9-86,3)	0,2 (0,1-0,2)	0,9 (0,7-1,1)	3,2 (2,2-6,3)
	femmine	12	87,5 (86,7-88,2)	0,21 (0,2-0,3)	1,0 (0,8-1,2)	4,2 (3,0-7,2)
MCH (pg)	tutti	20	29,5 (29,3-29,8)	0,8 (0,7-0,9)	0,3 (0,0-0,5)	4,7 (3, 6-6,9)
MCHC (g/L)	tutti	21	340 (339-341)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,6-1,0)	1,8 (1,3-2,6)
	maschi	9	343§ (342-344)	0,7 (0,6-0,9)	0,8 (0,5-1,1)	0,9 (0,6 -2,0)
	femmine	12	338 (337-340)	0,8 (0,7-1,0)	0,9 (0,6-1,2)	2,1 (1,4-3,6)
RDW-SD (fL)	tutti	20	40,9 (40,5-41,3)	0,7 (0,6-0,8)	1,6 (1,4-1,9)	6,3 (7,9-9,3)
RDW-CV (%)	tutti	20	12,9 (12,8-13,1)	0,5 (0,4-0,6)	1,0 (0,9-1,2)	6,8 (5,3-10,2)
Micro-R (%)	tutti	21	2,3 (2,1-2,5)	3,8 (3,4-4,4)	10,9 (9,3-12,9)	NA
Ret# (10 ⁹ /L)	tutti	20	52,6 (50,1-55,1)	5,5 (4,8-6,4)	7,8 (6,4-9,5)	29,1 (22,2-43,1)
Ret-He (pg)	tutti	21	33,7 (33,4-33,9)	0,5 (0,5-0,6)	0,9 (0,8-1,2)	4,2 (3,4-6,5)
IRF (%)	tutti	21	8,51 (8,03-9,00)	9,8 (8,7-11,4)	16,4 (13,8-19,8)	32,8 (24,6-48,0)
WBC (x10 ⁹ /L)	tutti	21	6,10 (5,92-6,28)	1,5 (1,3-1,7)	11,1 (9,62-13,18)	15,0* (10,9-22,5)
NE (x10 ⁹ /L)	tutti	21	3,42 (3,27-3,57)	1,9 (1,7-2,2)	14,6 (12,7-17,2)	24,1 (17,9-35,4)
LY (x10 ⁹ /L)	tutti	21	2,06 (1,99-2,14)	2,7 (2,4-3,1)	11,0 (9,5-13,0)	23,0§ (17,2-34,2)
MO (x10 ⁹ /L)	tutti	21	0,54 (0,52-0,56)	3,9 (3,5-4,5)	13,4 (11,6-15,9)	22,2 (11,5-32,7)
EO (x10 ⁹ /L)	tutti	19	0,16 (0,14-0,17)	9,5 (8,3-11,1)	15,6 (13,0-19,1)	NA
BA (x10 ⁹ /L)	tutti	21	0,044 (0,041-0,046)	12,2 (10,7-14,1)	12,8 (10,1-16,1)	33,9 (25,5-49,5)

Tabella 2
Continua

Parametri		N° soggetti	Media (95%IC)	CV _A % (95%IC)	CV ₁ % (95%IC)	CV _G % (95%IC)
IG (x10 ⁹ /L)	tutti	21	0,042§ (0,039-0,044)	17,8 (15,7-20,7)	19,7 (15,6-24,8)	30,3* (22,1-46,4)
PLT (10 ⁹ /L)	tutti	21	240,7 (231,9-249,4)	1,1 (1,0-1,3)	7,2 (6,37-8,5)	15,4* (11,5-22,7)
PDW (fL)	tutti	21	12,7 (12,4-12,9)	3,1 (2,7-3,6)	4,2 (3,5-5,2)	12 (9,1-17,5)
MPV (fL)	tutti	21	10,7 (10,5-10,8)	1,2 (1,1-1,4)	2,3 (1,9-2,8)	7,2 (5,4-10,4)
P-LCR (%)	tutti	19	30,5 (29,5-31,5)	2,9 (2,6-3,4)	7,0 (6,0-8,)	20,7 (15,7-30,0)
PCT (%)	tutti	21	0,25 (0,247-0,26)	2,5 (2,2-2,9)	6,4 (5,5-7,6)	14,5* (10,8-21,3)

95%IC, intervallo di confidenza al 95%; RBC, conteggio delle emazie; Hb, emoglobina; Ht, ematocrito; MCV, volume corpuscolare eritrocitario medio; MCH, contenuto medio di emoglobina; MCHC, contenuto medio percentuale di emoglobina delle emazie; RDW-SD e RDW-CV, ampiezza della curva di distribuzione delle emazie; Micro-R, percentuale di emazie microcitiche; Ret#, conteggio reticolocitario; Ret-He, contenuto medio emoglobinico reticolocitario; IRF, Frazione immatura reticolocitaria; WBC, conteggio dei leucociti; NE, conteggio dei neutrofilii; LY, conteggio dei linfociti; §, CV_G calcolato dopo trasformazione logaritmica dei dati; MO, conteggio dei monociti; EO, conteggio degli eosinofili; BA, conteggio dei basofili; IG: conteggio dei granulociti immaturi; PLT, conteggio delle piastrine; PDW, ampiezza della curva di distribuzione delle piastrine; MPV, volume piastrinico medio; P-LCR, percentuale di grandi piastrine; PCT, piastrinocrito; NA, non applicabile;

§, differenza statisticamente significativa tra uomini e donne.

*CV_G calcolato su 20 soggetti.

Tabella 3

Obiettivi delle specifiche di qualità analitica (APS), per imprecisione: (CV_{APS}), bias (B_{APS}) ed errore totale (TE_{APS}), differenza critica (DC) ed indice di individualità dell'esame emocromocitometrico. Tabella modificata dai riferimenti 11, 12, 13.

Parametri	N° soggetti	CV _{APS} % (95%IC)	B _{APS} % (95%IC)	TE _{APS} % (95%IC)	DC% (95%IC)	Indice di individualità
	tutti	0,9 (0,8-1,1)	2,3 (1,8-3,3)	3,8 (3,0-5,1)	5,3 (4,5-6,2)	0,2
RBC (10 ¹² /L)	maschi	0,7 (0,6-0,9)	2,0 (1,3-3,8)	3,2 (2,3-5,7)	4,3 (3,4-5,6)	0,2
	femmine	1,2 (1,0-1,5)	1,9 (1,3-3,1)	3,8 (3,0-5,6)	6,9 (5,7-8,6)	0,3
Hb (g/L)	tutti	1,0 (0,9-1,2)	2,1 (1,6-3,0)	3,8 (3,1-5,0)	5,8 (5,0-6,8)	0,2
	maschi	0,7 (0,5-0,9)	1,6 (1,1-3,1)	2,7 (1,9-4,5)	3,9 (3,1-5,1)	0,2
	femmine	1,1 (0,9-1,4)	1,8 (1,3-3,0)	3,7 (2,8-5,4)	6,5 (5,4-8,1)	0,3
Ht (L/L)	tutti	1,2 (1,1-1,4)	1,9 (1,5-2,8)	4,0 (3,2-5,2)	7,0 (6,0-8,2)	0,3
	maschi	1,1 (0,9-1,5)	1,5 (1,1-2,9)	3,4 (2,5-5,3)	6,4 (5,2-8,4)	0,4
	femmine	1,3 (1,1-1,6)	1,7 (1,2-2,8)	3,8 (3,0-5,5)	7,4 (6,1-9,2)	0,4
MCV (fL)	tutti	0,4 (0,4-0,5)	1,0 (0,8-1,4)	1,7 (1,4-2,3)	2,5 (2,2-3,0)	0,2
	maschi	0,4 (0,3-0,6)	0,8 (0,6-1,6)	1,5 (1,1-2,5)	2,4 (1,9-3,1)	0,3
	femmine	0,5 (0,4-0,6)	1,1 (0,8-1,8)	1,9 (1,4-2,8)	2,7 (2,2-3,3)	0,2
MCH (pg)	tutti	0,1 (0,0-0,2)	1,2 (0,9-1,7)	1,4 (0,9-2,1)	2,3 (1,9-2,8)	0,1

Tabella 3
Continua

Parametri	N° soggetti	CV _{APS} % (95%IC)	B _{APS} % (95%IC)	TE _{APS} % (95%IC)	DC% (95%IC)	Indice di individualità
	tutti	0,4 (0,7-1,0)	0,5 (0,4-0,7)	1,2 (0,9-1,5)	3,1 (2,6-3,8)	0,4
MCHC (g/L)	maschi	0,4 (0,3-0,5)	0,3 (0,2-0,6)	0,9 (0,6-1,5)	2,9 (2,2-3,9)	0,9
	femmine	0,4 (0,3-0,6)	0,6 (0,4-0,9)	1,3 (0,9-1,9)	3,3 (2,5-4,2)	0,4
RDW-SD (fL)	tutti	0,8 (0,7-1,0)	1,6 (-2,6)	2,6 (2,1-3,6)	4,8 (4,1-5,7)	0,3
RDW-CV (%)	tutti	0,5 (0,4-0,6)	1,7 (1,3-2,6)	2,6 (2,1-3,6)	3,2 (2,7-3,8)	0,2
Micro-R (%)	tutti	5,5 (4,7-6,5)	16,9 (12,8-24,5)	25,9 (20,5-35,2)	32,0 (27,4-37,8)	NA
Ret# (10 ⁹ /L)	tutti	3,9 (3,2-4,8)	7,5 (5,8-11)	13,9 (11-18,9)	26,4 (21,4-31,8)	0,3
Ret-He (pg)	tutti	0,5 (0,4-0,6)	1,1 (0,9-1,7)	1,9 (1,5-2,6)	3,0 (2,6-3,6)	0,2
IRF (%)	tutti	8,2 (6,9-9,9)	9,2 (7,1-13)	22,7 (18,4-29,3)	53,0 (45,2-63,3)	0,5
WBC (x10 ⁹ /L)	tutti	5,6 (4,8- 6,9)	4,7 (3,6- 6,6)	13,8 (11,6-18,0)	31,0 (26,9-38,5)	0,7
NE (x10 ⁹ /L)	tutti	7,3 (6,4-8,6)	7,0 (5,5-9,8)	19,1 (16,0-24,0)	40,8 (35,5-48,0)	0,6
LY (x10 ⁹ /L)	tutti	5,5 (4,8-6,5)	6,4 (4,9-9,1)	15,4 (12,7-19,9)	31,4 (27,1-37,0)	0,5
MO (x10 ⁹ /L)	tutti	6,7 (5,8-8,0)	6,5 (4,1-9,1)	17,5 (13,7-22,2)	38,7 (33,6-45,8)	0,6
EO (x10 ⁹ /L)	tutti	7,8 (6,5-9,6)	15,9 (11,9-23,1)	28,7 (22,6-38,9)	50,6 (42,7-61,2)	NA
BA (x10 ⁹ /L)	tutti	6,4 (5,1-8,1)	9,1 (6,9-13,0)	19,6 (15,2-26,3)	49,0 (40,8-59,3)	0,4
IG (x10 ⁹ /L)	tutti	9,9 (7,8-12,4)	9,0 (6,8-13,2)	25,3 (19,6-33,6)	73,5 (61,3-89,5)	0,7
PLT (10 ⁹ /L)	tutti	3,6 (3,1-4,3)	4,3 (3,3-6,1)	10,2 (8,4-13,1)	20,2 (17,6-23,9)	0,5
PDW (fL)	tutti	2,1 (1,7-2,6)	3,2 (2,4-4,6)	6,7 (5,3-8,8)	14,5 (12,3-17,4)	0,4
MPV (fL)	tutti	1,2 (1-1,4)	1,9 (1,4-2,7)	3,8 (3,1-5)	7,2 (6,2-8,6)	0,3
P-LCR (%)	tutti	3,5 (3-4,2)	5,5 (4,2-7,8)	11,3 (9,2-14,7)	21,1 (18,1-25,1)	0,3
PCT (%)	tutti	3,2 (2,7-3,8)	4,0 (3-5,7)	9,2 (7,6-11,9)	19,0 (16,4-22,5)	0,4

RBC, conteggio delle emazie; Hb, emoglobina; Ht, ematocrito; MCV, volume corpuscolare eritrocitario medio; MCH, contenuto medio di emoglobina; MCHC, contenuto medio percentuale di emoglobina delle emazie; RDW-SD e RDW-CV, ampiezza della curva di distribuzione delle emazie; Micro-R, percentuale di emazie microcitiche; Ret#, conteggio reticolocitario; Ret-He, contenuto medio emoglobinico reticolocitario; IRF, frazione immatura reticolocitaria; WBC, conteggio dei leucociti; NE, conteggio dei neutrofilii; LY, conteggio dei linfociti; MO, conteggio dei monociti; EO, conteggio degli eosinofili; BA, conteggio dei basofili; IG, conteggio dei granulociti immaturi; PLT, conteggio delle piastrine; PDW, ampiezza della curva di distribuzione delle piastrine; MPV, volume piastrinico medio; P-LCR, percentuale di grandi piastrine; PCT, piastrinocrito.

Per quanto riguarda la linea eritrocitaria, i valori medi della maggior parte dei parametri sono apparsi inferiori nel sesso femminile rispetto a quello maschile. Di conseguenza, i CV_i hanno rivelato un andamento

opposto, con CV_i generalmente superiori nelle donne rispetto agli uomini (dati omessi) ed in particolare per RBC e Hb sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i CV_i (Tabella 2). I CV_i dei parametri

eritrocitari più elevati nelle donne sono spiegabili dalla durata dello studio (cinque settimane) superiore alla durata complessiva di un ciclo mestruale considerando che, nel gruppo, 10 donne su 12 erano in età fertile.

Le stime di VB ottenute nel nostro studio, sia i CV_1 , così come i valori di CV_G , per la maggior parte dei parametri, eritrocitari, piastrinici, reticolocitari e di tutti i parametri leucocitari, sono inferiori a quelli presenti sul database online sulla VB (10). Occorre però tener presente che il confronto diretto fra i dati ottenuti in questo studio e quelli del database di Westgard (10) può essere fuorviante, poiché le informazioni disponibili nel database online sono datate. Esse sono infatti state ottenute utilizzando analizzatori che non sono più commercializzati e le cui prestazioni analitiche erano inferiori a quelle degli attuali emocitometri, oltre ad essere metodo-dipendenti. È nota, infatti, la carenza di armonizzazione e standardizzazione per molti parametri dell'esame emocromocitometrico (30).

Le differenze fra i dati di VB possono essere attribuite principalmente alla eterogeneità degli studi da cui sono stati ottenuti i dati online di Westgard, e principalmente imputabile a dimensioni del campione, tempistiche dello studio e dei prelievi, caratteristiche della popolazione inclusa nello studio, spesso non omogenee e confrontabili per età e sesso (10, 31-37).

Appare quindi importante poter disporre di dati relativi alla VB aggiornati e robusti, validi per le attuali tecnologie, considerando anche che nell'ultimo anno sono stati commercializzati cinque nuovi analizzatori, in grado di fornire fino a sessanta parametri ematologici, spesso metodo- e strumento-dipendenti (30).

Rispetto alla globalità dei risultati dello studio, meritano un approfondimento i dati di VB ottenuti per i NE. Pur risultando i valori di CV_1 e CV_G inferiori rispetto a quelli riportati nel database online sulla VB (10), essi appaiono circa raddoppiati (14,6% versus 6,3% e 24,1% versus 13,8% rispettivamente per CV_1 e CV_G) rispetto a quelli ottenuti in un recente studio da Tang et al. (38), non incluso fra le referenze del database online sulla VB (10). Lo studio descritto da Tang et al. non è stato realizzato in accordo ai criteri EFLM ed è stato condotto su un gruppo di 40 soggetti cinesi (21 donne e 19 maschi), sviluppato su tre giorni. Questo periodo temporale dello studio non tiene conto dell'intero ciclo della cinetica cellulare dell'emopoiesi, cosicché i risultati non sembrano confrontabili con i dati ottenuti nel nostro studio, che si sviluppa su un periodo temporale di cinque settimane. Analoga considerazione può essere fatta per lo studio di Coşkun et al. (28), sviluppato su un periodo temporale di 10 settimane. Per queste ragioni è plausibile che la VB di alcuni parametri possa essere condizionata dal tempo di durata dello studio e dalla periodicità del prelievo. A conferma di questa ipotesi, i nostri studi condotti sullo stesso gruppo di soggetti con lo stesso protocollo di analisi, che hanno previsto la valutazione della VB su un periodo di cinque giorni e di cinque settimane, in generale hanno confermato che i dati di VB ottenuti con il campionamento inferiore alla settimana (5 giorni) risultano generalmente inferiori ai

dati di VB ottenuti con il campionamento temporale di 5 settimane (11-13).

Un altro aspetto meritevole di attenzione del nostro studio è la differenza fra i valori di DC degli indici eritrocitari: RDW-SD e RDW-CV, rispettivamente 4,8% e 3,2% (Tabella 3). Entrambi i parametri riflettono l'ampiezza della curva di distribuzione delle emazie, e quindi il grado di anisopoichilocitosi delle emazie stesse, malgrado il dato sia ottenuto con algoritmi di calcolo differenti, che tengono conto di misurazioni di diverse caratteristiche cellulari. Il parametro RDW-CV è disponibile per tutti gli analizzatori ematologici, contrariamente al parametro RDW-SD. Tale discrepanza supporta il suggerimento di utilizzare RDW-CV per esprimere il grado di anisocitosi e migliorare così anche la standardizzazione nel riportare i risultati. Il calcolo dell'espressione di RDW come CV è comune a tutti gli strumenti, e l'impiego di questo parametro può consentire lo sviluppo di adeguati percorsi di armonizzazione dei metodi, anche utilizzando citometri a flusso basati su diverse tecniche analitiche (39).

Considerando la ricaduta pratica dei risultati dello studio e l'eterogeneità dei metodi analitici adottati, l'insufficiente armonizzazione fa sì che al momento solo i dati di VB per i parametri standard dell'emocromo (RBC, Hb, Ht, MCH, MCHC, MCV, RET), per cui è stato dimostrato un buon accordo tra diverse tecnologie, possano essere traslati ad altri analizzatori (40).

Le stime di VB ottenute in questo studio hanno permesso una rivalutazione dei traguardi analitici, che risultano inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura (11-13), suggerendo la necessità di un aggiornamento dello stato dell'arte.

Così come per i dati di CV_1 , anche i valori di DC calcolati nel nostro studio appaiono inferiori a quelli del database online sulla VB (10) per la maggior parte dei parametri considerati.

In ogni caso è importante ricordare che ogni laboratorio dovrebbe verificare che la propria imprecisione sia congruente con i CV_1 , recepiti dalla letteratura scientifica.

La verifica con il calcolo dell'II conferma come questo, nella maggior parte dei casi, sia inferiore a 0,6 fatta eccezione di MCHC negli uomini, WBC, NE, MO ed IG che hanno valori compresi fra 0,6 e 0,7. In ogni caso è quindi suggerita la valutazione della DC nel monitoraggio del CBC dei pazienti.

CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio ha consentito di calcolare la VB dei principali parametri dell'esame emocromocitometrico comuni a tutti gli emocitometri oggi disponibili nel mercato ottenuti con l'analizzatore ematologico Sysmex XN e anche di alcuni parametri di approfondimento strumento-specifici. Queste informazioni sono essenziali per definire le APS e per stabilire il significato delle eventuali modifiche dei parametri durante il monitoraggio dei pazienti per una migliore ed oggettiva applicazione di questi parametri

nella pratica clinica.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

- Lecompte TP, Bernimoulin MP. Novel parameters in blood cell counters. *Clin Lab Med* 2015;35:209–24.
- Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* 2009;31:277–97.
- Pastoret C, Sunnaram B, Fest T, et al. Integration of immature granulocytes quantification with the version 2.0 UniCel DxH 800 in the hematology strategy. *Am J Clin Pathol* 2016;145:552–9.
- Yang JH, Kim Y, Lim J, et al. Determination of acute leukemia lineage with new morphologic parameters available in the complete blood cell count. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:19–26.
- Jung JK, Kim JH, Park YJ, et al. Evaluation of cell population data on the UniCel DxH 800 Coulter cellular analysis system as a screening for viral infection in children. *Int J Lab Hematol* 2012;34:283–9.
- Briggs C, Longair I, Kumar P, et al. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol* 2012;65:1024–30.
- 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.
- Carobene A, Graziani MS, Lo Cascio C. Age dependence of within-subject biological variation of nine common clinical chemistry analytes. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:841–4.
- Cerriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009;46:8–17.
- Ricós C, Alvarez V, Cava F, et al. Biological Variation Database. <http://www.westgard.com/guest21/htm>. (ultimo accesso: dicembre 2018).
- Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, et al. Biological variation of platelet parameters determined by the Sysmex XN hematology analyzer. *Clin Chim Acta* 2017;42:125–8.
- Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. *Clin Chim Acta* 2017;473:147–56.
- Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of red blood cell and reticulocyte parameters in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:954–63.
- Bartlett WA, Braga F, Carobene A, et al. Biological Variation Working Group, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM), A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:879–85.
- Carobene A, Strollo M, Jonker N, et al. Biological Variation Working Group, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 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.
- Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, et al. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for evaluating studies on biological variation. *Clin Chem* 2018;64:501–14.
- Røraas T, Støve 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.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*, 8th ed., Iowa State University Press, 1989.
- Cochran WG. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann Hum Genet* 1941;11:47–52.
- Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 1965;52:591–611.
- Dixon WJ. Processing data for outliers. *Biometrics* 1953;9:74–89.
- Carobene A. Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:871–7.
- Carobene A, Røraas T, Sølvik UØ, et al. Biological variation estimates obtained from 91 healthy study participants for 9 enzymes in serum. *Clin Chem* 2017;63:1141–50.
- Carobene A, Marino I, Coşkun 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.
- 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.
- 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.
- Carobene A, Guerra E, Locatelli M, et al. Providing correct estimates of biological variation-not an easy task. the example of s100-β protein and neuron-specific enolase. *Clin Chem* 2018;64:1537–9.
- Coşkun A, Carobene A, Kilercik M, et al. Within-subject and between-subject biological variation estimates of 21 hematological parameters in 30 healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1309–18.
- 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.
- Buoro S, Lippi G. Harmonization of laboratory hematology: a long and winding journey. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1575–8.
- Costongs GM, Janson PC, Bas BM, et al. Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of haematological laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:69–76.
- Sandberg S, Rustad P, Johannesen B, et al. Within-subject biological variation of reticulocytes and reticulocyte-derived parameters. *Eur J Haematol* 1998;61:42–8.
- Maes M, Scharpé S, Cooreman W, et al. Components of biological, including seasonal, variation in hematological measurements and plasma fibrinogen concentrations in normal humans. *Experientia* 1995;51:141–9.
- Dot D, Miró J, Fuentes X. Within-Subject biological variation of hematological quantities and analytical goals.

- Arch Pathol Lab Med 1992;116:825–6.
35. Fraser CG, Wilkinson SP, Neville RG, et al. Biologic variation of common hematologic laboratory quantities in the elderly. *Am J Clin Pathol* 1989;92:465–70.
 36. Statland BE, Winkel P, Harris SC, et al. Evaluation of sources of variation of leukocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analyzers. *Am J Clin Pathol* 1977;69:48–54.
 37. Pineda-Tenor E, Laserna-Mendieta EJ, Timón-Zapata J, et al. Biological variation and reference change values of common clinical chemistry and haematologic laboratory analytes in the elderly population. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:851–8.
 38. Tang H, Jing J, Bo D, et al. Biological variations of leukocyte numerical and morphologic parameters determined by UniCel DxH 800 hematology analyzer. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:1392–6.
 39. Lippi G, Pavesi F, Bardi M, et al. Lack of harmonization of red blood cell distribution width (RDW). Evaluation of four hematological analyzers. *Clin Biochem* 2014;47:1100–3.
 40. Vis JY, Huisman A. Verification and quality control of routine hematology analyzers. *Int. J Lab Hematol* 2016;38:100–9.

Evaluation of a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from culture colonies

Andrea Bartolini¹, Margherita Scapaticci², Maira Zoppelletto¹, Giorgio Da Rin³

¹Medicina di Laboratorio, Ospedale di San Bassiano, AULSS 7 Pedemontana, Bassano del Grappa

²Medicina di Laboratorio, Ospedale San Camillo, Treviso

³Medicina di Laboratorio, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

ABSTRACT

Introduction: the increasing worldwide spread of multidrug resistant bacteria, in particular of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), represents a serious clinical and public health concern. An accurate and fast detection of infected patients or colonized carriers is thus mandatory.

Aim of this study was to assess the performance of a multiplex immunochromatographic assay (NG-Test CARBA 5, NG Biotech, Guipry, France) for the rapid detection of carbapenemases directly from pure bacterial colonies.

Methods: seventy-five non-replicated *Enterobacteriales* isolates with decreased susceptibility to carbapenems, including 71 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Escherichia coli* and 1 *Enterobacter cloacae*, were analysed with NG-Test CARBA 5. At the same time the combination disk test (CDT) was performed according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) indications, while confirmation of carbapenemase production was achieved by polymerase chain reaction (PCR).

Results: PCR assay could find 66 CPE strains, including 64 *Klebsiella pneumoniae* [53 producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), 5 New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), 2 class D oxacillinases (OXA-48), 1 Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM) and 3 co-producing NDM and OXA-48] and 2 *Escherichia coli* (2 NDM+OXA-48) while 9 isolates were found as non-carbapenemase producing: 7 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter cloacae*. CDT allowed us to consider those 9 strains as extended spectrum β -lactamase (ESBL) or AmpC β -lactamase producers. NG-Test CARBA 5 successfully identified 66/66 CPE showing 100% sensitivity and 100% specificity. Unlike NG-Test CARBA 5, CDT was not able to correctly identify 5 strains co-producing NDM and OXA-48 carbapenemases.

Conclusion: NG-Test CARBA 5 is a reliable assay that can be useful in settings requiring a rapid identification of CPE directly from culture colonies. Moreover, this test is an easy-to-use option that could avoid misidentification of carbapenemases co-producers strains.

INTRODUCTION

The increasing worldwide spread of multidrug resistant bacteria, especially of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), represents a serious clinical and public health concern because these strains are responsible for many hospital-acquired infections that are difficult to treat, resulting in longer hospital stay, higher costs and high mortality rates (1,2).

Carbapenemases are β -lactamases that hydrolyze penicillins, mostly cephalosporins and, to various

degrees, carbapenems and monobactams, conferring resistance to practically all β -lactams. Frequently CPE also carry mechanisms conferring resistance to other antimicrobial classes, leaving very few treatment options (3,4). Carbapenemase enzymes include class A carbapenemases (e.g. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC), class B or metallo- β -lactamases (MBLs) (e.g. Verona integron-encoded metallo- β -lactamase - VIM, New Delhi metallo- β -lactamase - NDM and IMP enzymes), and class D oxacillinases (e.g. OXA-48-like enzymes). In addition,

Corrispondenza a: Andrea Bartolini, Medicina di Laboratorio, Ospedale San Bassiano, AULSS 7 Pedemontana, Via del Lotti 40, 36061, Bassano del Grappa, Tel +39 0424 888725, E-mail andrea.bartolini@aulss7.veneto.it

Ricevuto: 30.01.2019

Revisionato: 05.03.2019

Accettato: 24.03.2019

Publicato on-line: 04.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.033

resistance to carbapenems in *Enterobacterales* can be due to a qualitative and/or quantitative deficiency of porine expression that cause a decreased antibiotic absorption, in association with overexpression of β -lactamases that possess very weak affinity for carbapenems, such as AmpC and extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) (1).

The association of multiple resistance determinants and their ability to spread rapidly among several bacterial species require an accurate and fast detection of CPE infected patients or colonized carriers for both therapeutic management and infection control purposes (4,5).

Phenotypic detection of CPE can be challenging due to a high variation of minimal inhibitory concentrations (MICs) of carbapenems. It is important to consider that some isolates show low MICs for these molecules and routine susceptibility tests may not correctly detect the mechanisms of resistance (4,6). For these reasons, during the last years, several phenotypic tests have been developed for detection of carbapenemases in *Enterobacterales*; most of them are however time-consuming because they require 2 to 24 hours after the first result of the screening susceptibility tests to obtain reliable results (4). The combination disk test method (CDT) was the first phenotypic assay available (4,7). Successively other methods based on the detection of carbapenem-hydrolysing activity were developed such as biochemical (colorimetric) assays (e.g. CarbaNP), the carbapenem inactivation method and the application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (8-10).

Today, molecular detection of carbapenemases by polymerase chain reaction (PCR) is considered the gold standard but it is still expensive, requires a high level of expertise to obtain accurate results and is not suitable for all clinical microbiology laboratories worldwide. For this reason, the recently introduced immunochromatographic lateral flow tests (ICT), able to detect carbapenemase-specific epitopes using monoclonal antibodies directly from cultured strains taking only around 15 minutes, represents a rapid alternative. Previous studies about these methods demonstrated high sensitivity and specificity for OXA-48-like, KPC, and NDM carbapenemases variants (11, 12).

The aim of this study was to assess the performance of a multiplex immunochromatographic assay (NG-Test CARBA 5, NG Biotech) for the rapid detection (15 minutes) of KPC, NDM, VIM, IMP and OXA-48 carbapenemases directly from pure colonies compared with molecular characterization performed by real time PCR reactions and with phenotypic characterization carried out by CDT.

METHODS

Bacterial strains

Seventy-five non-replicated *Enterobacterales* isolates, detected in clinical specimens delivered to our

laboratory and showing reduced susceptibility to carbapenems [meropenem and/or ertapenem MIC screening cut-off value: >0.125 mg/L, as defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (4)] were evaluated. This panel of strains included 71 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Escherichia coli* and 1 *Enterobacter cloacae*. MIC values for carbapenems were detected with broth microdilution method using Sensititre™ ITGNEGF panel (ThermoScientific, TREK Diagnostic Systems).

Molecular analysis

All the isolates were characterized to define the presence of carbapenemases by using the Xpert CARBA-R assay (Cepheid) as illustrated by Kost et al (13). The Xpert CARBA-R assay is a qualitative, *in vitro*, automated real-time PCR-based assay designed for the rapid detection of *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP*, and *blaOXA-48* carbapenem resistance genes.

Phenotypic assays

The complete set of strains was analysed with NG-Test CARBA 5. One colony of overnight growth harvested from Mueller Hinton agar plates was tested according to the manufacturer's instructions. Migration takes 15 minutes and, subsequently, the appearance of one or more red lines in the test region of the cassette, corresponding to the five carbapenemases KPC, NDM, VIM, IMP and OXA-48, was recorded. If the test was performed correctly, a control line appears (Figure 1).

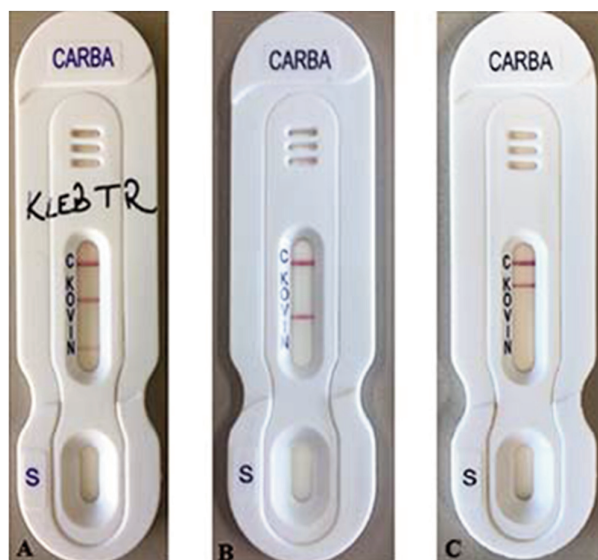


Figure 1

Examples of a positive test for a co-producing class D oxacillinases (OXA-48) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) strain (A), a Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM) producing strain (B) and a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing strain (C) by NG-Test CARBA 5. C: control, K: KPC, O: OXA-48 like, V: VIM, I: IMP, N: NDM.

Concurrently, CDT was performed according to EUCAST indications (4), using the KPC/metallo- β -lactamases confirmation kit (Rosco). This commercial kit is made of 4 tablets containing: meropenem (tablet A), meropenem and dipicolinic acid (MBL inhibitor) (tablet B), meropenem and cloxacillin (AmpC inhibitor) (tablet C), meropenem and boronic acid (KPC inhibitor) (tablet D). The results were evaluated as follows: the zone of inhibition of tablet A is compared to the inhibition zone of each carbapenem-plus-inhibitor tablets (B, C, and D). An inhibition zone showing a diameter difference above 5 mm indicates the presence of the enzyme activity. Each tablet indicates one specific resistance mechanism: tablet B points to MBL activity; tablet D reveals KPC activity, the association of tablets C and D shows AmpC activity coupled with porin loss (7). Negative results of all synergy tests are presumptive of an OXA-48 or ESBL activity. When an isolate presenting this phenotypic pattern associated to a negative result by PCR and ICT was detected, a CDT for the detection of ESBL by using disks or tablets containing the cephalosporin alone (cefotaxime and ceftazidime) and in combination with clavulanic acid (BBL Sensi-Disc, BD) was also performed. In this method the inhibition zone around the cephalosporin disk or tablet combined with clavulanic acid is compared with the zone around the disk or tablet with the cephalosporin alone. The test is considered positive if the inhibition zone diameter is ≥ 5 mm larger with clavulanic acid than without it (4).

Control strains

ATCC 700603 (*Klebsiella pneumoniae* SHV-18 ESBL producing) and NCTC 13438 (*Klebsiella pneumoniae* KPC producing) were used as negative and positive control, respectively.

RESULTS

PCR assay allowed to find 66 CPE strains, including 64 *Klebsiella pneumoniae* (53 producing KPC, 5 NDM, 2 OXA-48, 1 VIM and 3 co-producing NDM and OXA-48) and 2 *Escherichia coli* (2 co-producing NDM and OXA-48), while 9 isolates were found as non-carbapenemase producing: 7 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Escherichia coli* and 1 *Enterobacter cloacae*. Similarly, NG-Test CARBA 5 successfully identified 66/66 CPE (100% sensitivity and 100% specificity). For the strains that had negative results both with PCR and with NG-Test CARBA 5, CDT allowed to detect the AmpC production only for the *Enterobacter cloacae*, whereas for 7 *Klebsiella pneumoniae* and 1 *Escherichia coli* the test showed a possible production of ESBL or OXA-48 like enzymes. On these 8 strains we also performed CDT for detection of ESBL in order to discriminate the previous result, obtaining an inhibition zone diameter ≥ 5 mm, putative for ESBL production. In addition, unlike NG-Test CARBA 5, CDT was not able to correctly identify the 5 strains co-producing NDM and OXA-48 carbapenemases. All the

results are summarised in Table 1.

DISCUSSION

Carbapenemases disseminated in Europe from the second half of the 1990s representing a source of concern because they may confer resistance to virtually all β -lactams and are rapidly transferable (1,4). The variable level of expression of these enzymes and their frequent association with other resistance mechanisms result in a wide range of phenotypical patterns among CPE, which sometimes are difficult to identify correctly (4). Actually, nucleic acid amplification technology represents the gold standard since it can detect the presence of a specific carbapenemase gene with high performance and it is useful when it is necessary to obtain a rapid identification of the mechanisms of resistance (e.g. for rapid screening of faecal carriage of CPE). Unfortunately, this method is not yet available in all laboratories because of the high costs and the need of properly trained personnel. On the other hand, more accessible methods, such as CDT, despite having rather good performance, require at least 24 hours to obtain a result from the first colony growth that has to be evaluated for carbapenemase production.

Lateral immunocromatography, performed directly from culture colonies or from clinical sample (e.g. rectal swab), could represent a rapid and cost-effective alternative to culture and molecular tools (11,14,15). Our results show that NG-Test CARBA 5 is a reliable assay, with 100% of sensitivity and specificity, useful in settings requiring a rapid identification of CPE directly from culture colonies. Furthermore, this test is an easy-to-use option that allows avoiding misidentification of carbapenemases co-producers strains. Actually, CDT can miss detection of strains with enzyme co-production. For example, in our set we found 5 strains co-producing NDM and OXA-48 that CDT was not able to correctly identify in contrast to ICT that permitted to detect the presence of the two enzymes. Moreover, it is important to consider that combination of different phenotypic methods, able to distinguish different mechanisms, can be accessible in term of cost and useful for microbiological laboratory routine, allowing a high level of precision in typing. In our collection, the inclusion of CDT for ESBL with NG-Test CARBA 5 and CDT was able to discriminate between ESBL or AmpC producers among carbapenemases non-producer strains. A correct identification of the resistance mechanisms is useful not only for infection control and public health purposes (4), but it can be relevant also for the therapeutic approach, for example in the choice of ceftazidime/avibactam combination that is highly active against KPC but not against MBLs producers (15). Finally, we consider that it would be important to extend the evaluation to a greater number of CPE strains, such as IMP producers that have not been included in this study and have been reported difficult to detect by other authors (16), in order to obtain further confirmation of assay efficiency.

Table 1
Phenotypic and genotypic characteristics of isolates evaluated in the study.

Number of isolates	Species	Ertapenem MIC range (mg/L)	Meropenem MIC range (mg/L)	PCR	ICT	CDT
53	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	2 - > 64	KPC	KPC	KPC
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	4 - 8	NDM	NDM	MβL
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	64	VIM	VIM	MβL
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	> 64	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48	ESBL/OXA-48
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	4	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48	MβL
2	<i>Escherichia coli</i>	>1	> 64	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48	MβL
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	2	OXA-48	OXA-48	ESBL/OXA-48
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1	≤ 0.125 - 2	Undetected	Negative	ESBL/OXA-48*
1	<i>Escherichia coli</i>	>1	1	Undetected	Negative	ESBL/OXA-48*
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	>1	≤ 0.125	Undetected	Negative	AmpC

MIC, minimal inhibitory concentration; PCR, polymerase chain reaction; ICT, immunochromatographic test; CDT, combination disk test; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, New Delhi metallo-β-lactamase; MβL, metallo-β-lactamase; VIM, Verona integron-encoded metallo-β-lactamase; ESBL, extended-spectrum-β-lactamase.

*for these isolates combination disk test for ESBL was performed showing a positive result.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol Med 2012;18:263-72.
- Nordmann P, Cornaglia G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! Clin Microbiol Infect 2012;18:411-2.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011;17:1791-8.
- EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0 July 2017. http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/ (last accessed: January 2019).
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect Dis 2013;13:785-96.
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2013;68:487-9.
- Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, et al. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. Gut Pathog 2014;6:13.
- Dortet L, Agathine A, Nass T et al. Evaluation of the RAPIDEC. CARBA NP, the Rapid CARB Screen. and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2015;70:3014-22.
- van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One 2015;10:e0123690.
- Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G et al. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. J Clin Microbiol 2015;53:2163-71.
- Greissl C, Saleh A, Hamprecht A. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in

- Enterobacterales by a new multiplex immunochromatographic test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:331-5.
12. Hamprecht A, Vehreschild JJ, Seifert H et al. Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 2018;14;13:e0204157.
 13. Kost K, Yi J, Rogers B et al. Comparison of clinical methods for detecting carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pract Lab Med* 2017;18;8:18-25.
 14. Fauconnier C, Dodemont M, Depouhon A et al. Lateral flow immunochromatographic assay for rapid screening of faecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:357-9.
 15. Tuon FF, Rocha JL, Formigoni-Pinto MR. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime-avibactam: a systematic review. *Infection* 2018;46:165-81.
 16. Hopkins KL, Meunier D, Nass T et al. Evaluation of the NG-Test Carba 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48 like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:3523-6.

Comparative study of galectin-3, brain natriuretic peptide, cystantine C and high sensitivity troponin determinations in the diagnosis of heart failure in elderly italian males

Valverde Sara¹, Gessoni Gianluca², Garelli Elisabetta³, Valle Letizia³, Gessoni Francesca⁵, Massimo Iacoviello⁴, Zatta Matteo³, Valle Roberto³

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale Madonna della Navicella, Chioggia

²Servizio di Medicina Trasfusionale, Ospedale dell'Angelo, Mestre

³Cardiologia ed Unità Coronarica, Ospedale Madonna della Navicella, Chioggia

⁴Unità Operativa Complessa di Cardiologia Universitaria, Azienda Ospedaliera Universitaria, Policlinico Consorziale di Bari

⁵Scuola di Igiene e Sanità Pubblica Università di Padova.

ABSTRACT

Introduction: heart failure (HF) has been defined a modern pandemic. The complex array of physiologic, psychological, social and health care issues makes it a challenging chronic disease to diagnose and manage. Our study is aimed to evaluate a multi-markers approach in diagnosis of HF in aged males.

Methods: 68 Italian males aged >65 years have been enrolled; 25 were patients with heart failure (HF) and 43 were healthy controls. In all the subjects, measurements of high sensitivity troponin I (TNI), galectin-3 (GAL), cystatin C (CYS) and brain natriuretic peptide (BNP) were performed using routine methods.

Results: in patients with HF, mean concentrations of TNI, GAL, CYS and BNP were significantly higher ($p < 0.001$) than values observed in controls subjects. Only BNP and GAL showed a correlation with NYHA stage of HF. In this study, GAL and BNP demonstrated better diagnostic performances to differentiate of HF patients from controls subjects.

Conclusions: our study showed the usefulness of a strategy involving multiple biomarkers determination in laboratory diagnosis of HF in elderly males.

INTRODUCTION

Heart failure (HF) is a major public health problem worldwide, entailing high morbidity and mortality as well as high costs (1). This chronic syndrome associates with a low functional status and quality of life. Most patients with HF are elderly, constituting up to 80% of patients suffering from this disease with both incidence and prevalence of the condition increasing with age (2). In patients with HF, age is associated with an increased risk of cardiovascular events and mortality during short- and long-term follow-up. Elderly patients with HF often present with complex co-morbidities (hypertension, atrial fibrillation, peripheral vascular disease and coronary artery disease, valvular disease and kidney failure or anemia) and polypharmacy (3,4). The pathophysiological concept of HF has changed during

the last decade with increased understanding of a multiorgan neurohormonal response, low-grade myocardial damage as well as activation of immunological and inflammatory systems. As a consequence, a number of biomarkers for diagnosis and prognosis in HF have emerged (5-7).

Several studies have assessed the relevance of measuring troponin I (TNI) in patient with stable-chronic HF in order to establish the prognostic potential and future cardiovascular events (8). Addition of the brain natriuretic peptide (BNP) may improve the prognostic potential in patients with chronic HF as demonstrated by Tsutamoto et al, who showed that elevations of both BNP and TNI concentrations carry the highest risk of mortality (9).

Inflammatory and fibrotic processes are central to cardiac remodeling and the development of HF.

Corrispondenza a: Gianluca Gessoni MD. Transfusional Service Ospedale dell'Angelo 20170 Mestre (Venice) Italy
Tel 0039.041.9657175; E-mail gianluca.gessoni@aulss3.veneto.it

Ricevuto: 12.02.2019

Revisionato: 11.03.2019

Accettato: 16.04.2019

Publicato on-line: 04.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.040

Galectin-3 (GAL), secreted by activated macrophages, causes cardiac fibrosis via proliferation of cardiac fibroblasts and deposition and irreversible cross-linking of collagen I in myocytes. Recent examinations of GAL in the context of HF, have revealed the potential clinical value of this biomarker as a prognostic indicator (10-12). BNP plasma concentrations fluctuate depending on the severity of the disease. BNP increases particularly when there is an abnormal dilatation of the cardiac wall chamber, increased fluid volume or reduced elimination of peptides such as in kidney failure. Usually, BNP concentration <100 pg/mL allows to exclude HF. BNP levels in the acute HF can predict the risk of death or readmission within 30 days (13,14). In patients with chronic HF, BNP can predict future cardiac events and hospitalizations. Results from the Val-HeFT trial reported by Masson et al. (15) demonstrated that BNP and NT-pro BNP were the strongest predictors of mortality and hospitalization for HF (16).

Cystatin C (CYS) is a small protein molecule (approximately 13kDa) produced by virtually all nucleated cells, at a constant rate, freely filtered from the glomerular membrane and then completely reabsorbed without secretion by the proximal tubular cells. These characteristics made this protein an almost perfect candidate for estimating renal function being renal function a strong predictor of adverse events in HF (17,18).

The aim of the present study is to evaluate if combined measurement of TNI, GAL, BNP and CYS in the diagnosis of HF, could provide useful information in an elderly population with symptoms associated with HF in primary healthcare setting.

METHODS

Subjects

68 Italian males aged >65 years have been enrolled: twenty-five patients with a previous diagnosis of HF, aged between 65 and 83 years (median 72 years), and 43 healthy controls, aged between 65 and 81 years (median 69 years). 18 subjects of the control group were repeat blood donors and 25 were subjects recruited during a medical examination for non-competitive sports activities.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Local Health Authority; all patients provided written informed consent to be included in the study. The study was performed in accordance to the Helsinki declaration as revised in 1996.

Laboratory methods

At the initial subject examination, blood samples were collected for routine analysis. Several aliquots of EDTA plasma samples were stored at -80 °C for later determination of TNI, GAL CYS and BNP. TNI and GAL plasma concentrations were measured using immunoassays applied to ARCHITECT I2000SR

analyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). CYS and BNP plasma concentrations were measured using a ST-AIA-PACK-CYS and BNP immunoassays applied to AIA 2000 analyzer (TOSOH Corporation Tokyo Japan). In the present study cutoff value have been set as following: TNI, 39 ng/L; GAL, 16 ng/mL (19); CYS, 1.00 mg/L; BNP, 100 pg/mL (20,21).

Heart failure diagnosis

These subjects underwent an echocardiographic test with a portable CX-30 equipment. For the study of the left ventricular systolic function, the ejection fraction (EF) was calculated using the Simpson biplane method. The diagnosis of left ventricular systolic dysfunction requires the presence of an EF <50% (22-24). The study of diastolic function of the left ventricle was performed by evaluating the mitral inflow from the A4C projection.

Statistical analysis

Data were analyzed using MedCalc Ver.8.0.0 (Medcalc SW bvda Ostend, Belgium). Concentration of TNI, GAL, CYS and BNP are reported as median, I and III quartiles (IQ range). Differences between groups were analyzed using the independent-sample Mann-Whitney test for independent samples. Correlation analysis was performed using Spearman's rank correlation. Receiver operating characteristic (ROC) curve and area under the ROC curve (AUC) were calculated and compared by using the Hanley-McNeil test (25,26). P <0.05 was considered statistically significant. Moreover, sensitivity (SE), specificity (SP), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and correctly classified incidence (CCI) were calculated.

RESULTS

Among patients with HF, 16 (64%) had an EF <50% and were classified as left ventricular systolic dysfunction patients, while 9 (36%) had an EF >50% and were classified as HF with preserved left ventricular function. In patients with HF, median TNI concentration was 34.5 ng/L (IQ range 27.6 - 43.7), significantly higher ($p<0.001$) than values observed among control subjects (median 3.5 ng/L; IQ range 2.25 - 7.55). Furthermore, for all biomarkers considered in our study, the concentrations observed in HF patients were significantly higher than those measured in control subjects. These data are reported in table 1.

In figure 1, ROC curves are shown; for TNI AUC is 0.98 [confidence interval (CI95%) 0.87 - 0.98], for GAL 0.93 (CI95% 0.85 - 0.98), for CYS 0.95 (CI95% 0.89 - 0.99), for BNP 0.98 (CI95% 0.91 - 0.99). We did not observe any significant differences between AUCs: CYS versus BNP ($p=0.59$), GAL versus BNP ($p=0.76$), TNI versus BNP ($p=0.56$), GAL versus CYS ($p=0.41$), TNI versus CYS ($p=0.91$), TNI versus GAL ($p=0.38$).

Among patients with HF, 7 (28%), showed TNI concentration higher than the cutoff value, and in none of

Table 1
Characteristics of heart failure patients and healthy controls

Variable	Heart Failure Patients (n=25)	Healthy Controls (n=43)	P
Age, median (min-max)	72 years (65-83)	69 years (65-81)	
Etiology, n (%)			
Ischemic	10 (40%)		
Valvular	3 (12%)		
Primitive	4 (16%)		
Hypertensive	8 (32%)		
NYHA class, n (%)			
I	3 (12%)		
II	13 (52%)		
III	9 (36%)		
IV	0 (0%)		
EF, mean (SD)	42% (9)		
<50%, n (%)	16 (64%)		
>50%, n (%)	9 (36%)		
Comorbidities, n (%)			
Diabetes	6 (24%)		
COPD	3 (12%)		
CKD	10 (40%)		
HF symptoms	23 (92%)		
Treatment, n (%)			
ACEI	9 (36%)		
BB	14 (56%)		
MRA	9 (36%)		
DG	6 (24%)		
DIU	15 (60%)		
ARB	6 (24%)		
ICD	1 (4%)		
CRT	1 (4%)		
BNP pg/mL, median (IQ range)	65.0 (43.0-146.0)	23.0 (16.5-27.0)	<0.001
CYS mg/L, median (IQ range)	1.51 (1.07-2.01)	0.80 (0.65-0.85)	0.04
GAL ng/mL, median (IQ range)	20.6 (17.4-29.1)	10.4 (9.25-11.85)	0.008
TNI ng/L, median (IQ range)	34.5 (27.6-43.7)	3.5 (2.25-7.55)	<0.001

NYHA, New York Heart Association; EF, ejection fraction; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CKD, chronic kidney disease; ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitors; BB, beta blockers; MRA, mineralocorticoid receptors antagonists; DG, digitalis glycosides; DIU, diuretics; ARB, angiotensin receptors blockers; ICD, implantable cardioverter defibrillator; CRT, cardiac resynchronization therapy; BNP, brain natriuretic peptide; CYS, cystatin C; GAL, galectin 3; TNI, troponin I; IQ range, interquartile range.

these patients TNI concentration was below the limit of detection. No correlation has been observed between TNI concentration and NYHA class of patients. None of the control subjects showed TNI values higher than cutoff, and in 9 (21%) TNI concentrations were below the limit of detection. In all the HF patients we observed GAL concentrations higher than the cutoff, and a weak correlation between GAL values and NYHA class ($p=0.04$, $r=0.31$). In the control group we observed only 2 (4%) subjects with GAL values above the cutoff value. Among patients with HF, in 19 (76%) we found CYS

concentration higher than the cutoff value, and we did not find any correlation between CYS concentration and NYHA class of patients. Among patients with HF, 13 (52%) showed BNP concentrations above the cutoff value, and a weak correlation between BNP concentration and NYHA class of patients ($p=0.03$, $r=0.35$) was observed. BNP was normal in controls subjects.

As reported in Figure 2, among the 43 healthy controls, 39 (91%) presented all the biomarkers below the cutoff values and 4 (9%) presented elevation of a

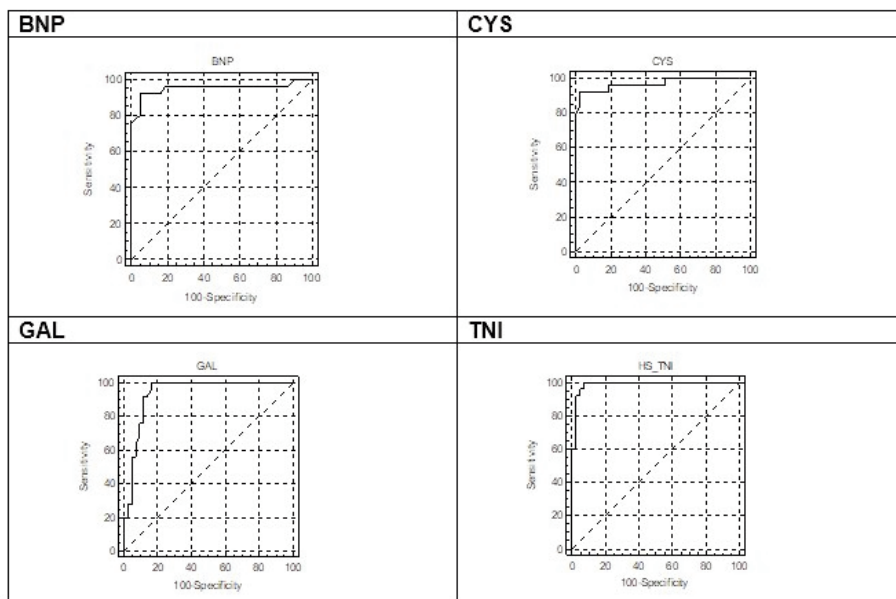


Figure 1
ROC curves of high sensitivity troponin I (TNI), Galectin 3 (GAL), Cystatin (CYS) and Brain natriuretic peptide (BNP) in differentiating heart failure patients (HF) from control subjects.

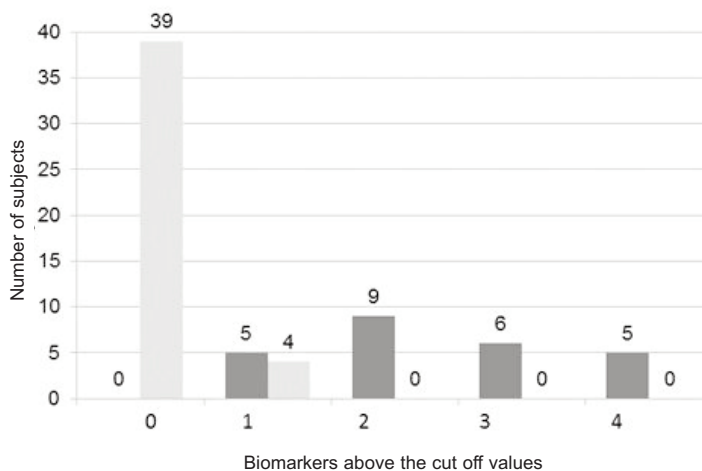


Figure 2
Number of subjects with elevated biomarkers plasma concentration in healthy controls (pale grey bars) and heart failure patients (dark grey bars).

single biomarker (in two cases it was the GAL and in the other two, it was CYS and TNI respectively). In contrast, among the 25 patients with HF, no one had all the biomarkers below the cutoff values, 5 (20%) had one biomarker, 9 (36%) had two, 6 (24%) had three and 5 (20%) had all the four biomarkers considered in this study above the cutoff values.

Table 2 shows the prevalence of HF patients with raised biomarkers concentration in relation to NYHA class.

The diagnostic performances of the biomarkers in differentiation of previously classified HF patients from healthy controls are shown in Table 3.

DISCUSSION

The pandemic trend in the last decade and demographic projections for the near future, classify HF as the cardiovascular disease involving the greatest financial burden: it currently uses up to 1-2% of the

Table 2*Prevalence of patients with raised concentration of biomarkers*

NHYA class	BNP	CYS	GAL	TNI
NHYA I (n= 3)	1 (33%)	3 (100%)	3 (100%)	1 (33%)
NHYA I (n= 13)	6 (46%)	9 (69%)	13 (100%)	10 (77%)
NHYA I (n= 9)	6 (67%)	7 (78%)	9 (100%)	6 (67%)

The first column reports NHYA classification and the number of patients assigned to each class; columns 2 to 5 show the number and the percentage of patients with increased concentration of the biomarker.

NHYA, New York heart association; BNP, brain natriuretic peptide; CYS, cystatin C; GAL, galectin 3; TNI, troponin I.

Table 3*Diagnostic characteristics of the biomarkers*

	BNP	CYS	GAL	TNI
Cutoff value	< 100 pg/mL	<1 mg/L	<18 ng/mL	<39 ng/L
SE	0.72	0.76	1.00	0.28
SP	1.00	0.98	0.95	1.00
PPV	1.00	0.98	0.93	1.00
NPV	0.78	0.88	1.00	0.70
CCI	0.93	0.91	0.91	0.74

SE: sensitivity; SP: specificity; PPV: predictive positive value; NPV: negative predictive value; CCI: correctly classified incidence. BNP, brain natriuretic peptide; CYS, cystatin C; GAL, galectin 3; TNI, troponin I.

health budgets of countries comparable to Italy. Available data on HF epidemiology in the developed countries, show that HF represents a disease of the elderly (27,28). HF is known to be a proteiform syndrome; in the elderly particularly, symptoms and signs may be atypical and can be simulated or disguised by co-morbidities such as respiratory disease, kidney function impairment, diabetes, cognitive decline, obesity, venous insufficiency. Clinical evaluation is typically unreliable for an early diagnosis of HF. With regard to prognosis and risk stratification, a variety of risk models have been developed to predict the mortality risk of general HF patients. However, less conclusive evidence is available for the elderly (27,28).

Myocardial stretch leads to production of pro-BNP that is later broken down into BNP and NT-pro-BNP. Higher concentration of BNP in the blood of a patient who presents to the emergency room is associated with greater probability of a diagnosis of HF. Higher BNP concentration on admission to the hospital is also associated with greater in-hospital mortality. BNP levels are inversely associated with obesity and may also be

influenced by the presence of kidney disease (14-16).

Cardiomyocyte necrosis releases troponin I or T (cardiac isomers of proteins from troponin-tropomyosin complex) into the circulation of an individual and they are typically useful in detection of a myocardial ischemia. Troponin T and I, measured with high sensitive assays show elevated values in patients with severe HF and therefore have been studied for the prediction of the onset of HF as well as for prognosis in patients with already established HF (14-16).

Renal function is a strong predictor of adverse events in HF. Current renal function measurements are imperfect, and CYS is considered a marker of glomerular filtration rate with better performances than creatinine [14-16].

GAL is a biomarker with a relevant role in the development and regulation of cardiac fibrosis and remodeling. In patients with acute decompensated HF, GAL levels seems to be predictive of mortality on short-term follow up. In fact, several authors have also suggested the superiority of GAL and the enhanced predictive power for mortality when used in associations

with BNP, in patients with both preserved and reduced left ventricular ejection fraction (14-16).

In summary, there are several biomarkers available demonstrating diagnostic, prognostic or predictive value in HF. Demonstration of the validity and the clinical utility of any specific biomarker across different sets of patients is essential before their introduction in routine clinical practice. Biomarkers may be able to reflect pathophysiologic process of heart disease, and also can provide meaningful information about prognosis and to assist the process of clinical decision making without duplicating any information that is already clinically available. Our data show that BNP, TNI and CYS have the best PPV and GAL has the best NPV in this group of subjects when compared to other biomarkers. In our opinion, the results obtained in this study could provide useful information about the possible use of GAL in the diagnosis of HF among the elderly patients. It has previously suggested that GAL has a lower or a similar diagnostic accuracy when compared to natriuretic peptides (29,30). However, the accuracy of GAL could be greater among elderly, because it is able to more accurately reflect the pathophysiological mechanisms underlying HF in the older age. Moreover, GAL could be directly involved in the genesis of HF promoting inflammation and cardiac fibrosis. Finally, this association could be even more evident in patients with HF and preserved EF, where GAL has also shown a stronger prognostic value (31,32). As matter of fact, in our series of 25 patients with HF, 9 (36%) had a preserved left ventricular function. The results obtained in this study show that the considered biomarkers have a good diagnostic power since they seem able to reliably discriminate patients with HF from healthy subjects. However, they show only a modest correlation with the severity of HF; this could be due to the fact that in the group of patients enrolled in this study, there were no patients in class IV NYHA. Other results difficult to interpret are that we found more elevated biomarkers in class II, than in class III.

Our study presents some limitations; in particular, the number of patients might not have been large enough to enable us to show the independent predictive power of some biomarkers (TNI for instance). The presence in the population of patients with symptoms of HF may have driven the superiority of BNP. Our study is obviously not a randomized prospective study and thus our conclusions should be seen as hypothesis generating results. Even with the limitations mentioned above, on the basis of the data obtained, we believe that in the diagnosis of HF in elderly patients, an approach based on the simultaneous measurement of multiple biomarkers, could be useful. We used a combination of biomarkers, that are considered able to explore different aspects related to HF. In fact, BNP is considered a cardiac function index, GAL an index of myocardial fibrosis/reshaping, TNI an indicator of myocardiocyte injury, CYS an excellent indicator of renal function (14-16), four factors of great importance in the physiopathology of HF. Really, this group of biomarkers

showed a good performance in identifying patients with HF compared to healthy control. We therefore believe that a diagnostic approach based on the use of multiple biomarkers may be of relevant value in the diagnosis of HF in elderly patients.

CONFLICT OF INTERESTS

None.

REFERENCES

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics–2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:e2-e220.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics–2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:143-52.
3. Cherubini A, Oristrell J, Pla X, et al. The persistent exclusion of older patients from ongoing clinical trials regarding heart failure. *Arch Intern Med* 2011;171:550-6.
4. Moser DK, Dracup K, Evangelista LS, et al. Comparison of prevalence of symptoms of depression, anxiety, and hostility in elderly patients with heart failure, myocardial infarction, and a coronary artery bypass graft. *Heart Lung* 2010;39:378-85.
5. Battle M, Campos B, Farrero M, et al. Data on clinical characteristics of a heart failure patients' cohort with reduced ejection fraction and analysis of the circulating values of five different heart failure biomarkers; high sensitivity troponin T, galectin-3, C-terminal propeptide of type I procollagen, soluble AXL and BNP. *Data Brief* 2016;9:876-82.
6. Cow SL, Maisel AS, Anad I, et al. Role of biomarkers for the prevention, assessment, and management of heart failure. *Circulation* 2017;135:1054-91.
7. Aspromonte N, Giukizia MM, Clerico A et al. Documento di consenso ANMCO/ ELAS/SIBIOC: Raccomandazioni sull'uso dei biomarcatori nello scompenso cardiaco. *G Ital Cardiol* 2015;17:615-56.
8. Masson S, Anand I, Favero C, et al. Serial Measurement of cardiac troponin t using a highly sensitive assay in patients with chronic HF. *Circulation* 2012;125:280-8.
9. Tsutamoto T, Kawahara C, Nishiyama K, et al. Prognostic role of highly sensitive cardiac troponin I in patients with systolic heart failure. *Am Heart J* 2010;159:63-7.
10. McCullough PA, Olobatoke A, Vanhecke TE. Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with HF. *Rev Cardiovasc Med* 2011;12:200-10.
11. Grandin EW, Jarolim P, Murphy SA, et al. Galectin-3 and the development of HF after acute coronary syndrome: pilot experience from PROVE IT-TIMI 22. *Clin Chem* 2012;58:267-73.
12. de Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in HF with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* 2011;43:60-8.
13. Stoica A, Şorodoc V, Lionte C, Jet al. Acute cardiac dyspnea in the emergency department: diagnostic value of N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide and galectin-3. *J Int Med Res* 2019;47:159-72.
14. Metra M, Cotter G, El-Khorazaty J, et al. Acute heart failure in the elderly: differences in clinical characteristics, outcomes, and prognostic factors in the VERITAS Study. *J Card Fail* 2015;21:179-88.
15. Masson S, Latini R, Anand IS, et al. Direct comparison of

- B-Type Natriuretic Peptide (BNP) and Amino-Terminal proBNP in a Large Population of Patients with Chronic and Symptomatic Heart Failure: The Valsartan Heart Failure (Val-HeFT) Data. *Clin Chem* 2006;52:1528-38.
16. Alehagen U, Dahlström U, Jens F, et al. Prognostic Assessment of Elderly Patients with Symptoms of Heart Failure by Combining High-Sensitivity Troponin T and N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Measurements. *Clin Chem* 2010;11:1718-24.
 17. Dupont M, Wu Y, Hazen SL, et al. Cystatin C identifies patients with stable chronic heart failure at increased risk for adverse cardiovascular events. *Circ Heart Fail* 2012;5:602-9.
 18. Akerblom A, Helmersson-Karlqvist J, Flodin M et al. Comparison between cystatin C- and creatinine-estimated glomerular filtration rate in cardiology patients. *Cardiorenal Med* 2015;5:289-96.
 19. Mueller T, Egger M, Leitner E, et al. Reference values of galectin-3 and cardiac troponins derived from a single cohort of healthy blood donors. *Clin Chem Acta* 2016;456:19-23.
 20. Franzini M, Masotti S, Prontera C, et al. Systematic differences between BNP immunoassays: comparison of methods using standard protocols and quality control materials. *Clin Chim Acta* 2013;424:287-91.
 21. Finney H1, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 2000;37:49-59.
 22. Frigerio M, Oliva F, Turazza MF, et al. Prevention and management of chronic heart failure in management of asymptomatic patients. *Am J Cardiol* 2003; 91 (suppl): 4F-9F.
 23. Fonarow GC Epidemiology and risk stratification in acute heart failure. *Am Heart J* 2008;155:200-7.
 24. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2016;18:891-975.
 25. Rocchi M. La valutazione di un esame diagnostico mediante curve ROC: alcune osservazioni. *Biochim Clin* 2001;25:382-9.
 26. D'Arrigo G, Provenzano F, Torino C, et al. I test diagnostici e l'analisi della curva ROC. *Giorn Ital Nefr* 2011;28:642-7.
 27. McCullough PA, Philbin EF, Spertus JA, et al. Confirmation of a heart failure epidemic: findings from the resource utilization among congestive heart failure (R.E.A.C.H.) Study. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:60-9.
 28. Julien C, Leroux Y, Colin C. Approche medico-conomique de l'insuffisance cardiaque. Un enjeu de santé publique. *Etudes Eval Cardiovasc* 1999;6:1-12.
 29. Levy D, Kenchaiah S, Larson M, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397-402.
 30. Mogensen UM, Erbsoll M, Andersen M, et al. Clinical characteristics and major comorbidities in heart failure patients more than 85 years of age compared with younger age groups. *Eur J Heart Fail* 2011;13:1216-23.
 31. Oudejans I, Mosterd A, Bloemen JA, et al. Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *Eur J Heart Fail* 2011;13:518-27.
 32. Gambassi G, Forman DE, Lapane KL, et al. Management of heart failure among very old persons living in long term care: has the voice of trials spread? *Am Heart J* 2000;139:85-93.

Studio preliminare del microbiota intestinale, cutaneo e della mucosa orale in pazienti affetti da Pemfigo Volgare e Pemfigoide Bolloso

Elisa De Paolis^{1,2}, Giovanni Luca Scaglione^{2,3}, Maria De Bonis^{1,2}, Luca Fania⁴, Flavio Mignone⁵, Ettore Capoluongo^{1,2}

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

²Laboratorio di Diagnostica Molecolare Avanzata (DIMA), Istituto Dermatologico dell'Immacolata (IDI)-IRCCS, FLMM, Roma

³Laboratorio di Oncologia Molecolare, Fondazione "Giovanni Paolo II", Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso

⁴Prima Divisione di Dermatologia, Istituto Dermatologico dell'Immacolata (IDI)-IRCCS, FLMM, Roma

⁵Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Alessandria

ABSTRACT

Preliminary study of the microbiome in the gut, skin and oral mucosa of patients affected by Pemphigus Vulgaris and Bullous Pemphigoid.

Introduction: the study of the human microbiome is one of the most dynamic current topics in biomedical research. A significant challenge in this field is the development of cost effective method for a robust interrogation of microbiota composition. Advances in next-generation sequencing (NGS) technologies have allowed for efficient and molecular-based analysis of microbial communities. Association between diseases and imbalance of the microbial populations are today well investigated.

Methods: *Pemphigus Vulgaris* (PV) and *Bullous Pemphigoid* (BP) are two rare autoantibody-mediated blistering skin diseases. In this pilot study, we characterized the intestinal, cutaneous and oral mucosal microbiota composition in PV/BP patients, in order to evaluate the potential role of the bacterial composition in these dermatological disorders. Particularly, we performed a high-throughput sequencing analysis of the V3-V4 hypervariable regions of 16S rRNA for the evaluation of bacterial composition of stool, skin and oral mucosa samples in PV (n=12) and BP (n=8) patients.

Results: a similar composition of the intestinal microbiota was observed in PV and BP patients. The evaluation of skin lesions revealed a prevalence of Firmicutes phylum in both patients' groups. In the cutaneous microbiota, we identified a significant decreased abundance of Bacteroidetes phylum compared to healthy controls.

Conclusions: the results obtained from our standardized NGS pipeline, reinforced by correlation with other clinical and biochemical parameters, will contribute to clarify the mechanisms of these rare diseases.

INTRODUZIONE

Il microbiota umano è definito come la totalità dei microrganismi che colonizzano il corpo umano. Il termine microbioma si riferisce invece all'intero patrimonio genetico posseduto dal microbiota (1). L'interesse sempre crescente per il microbioma umano e per la sua relazione con lo stato di salute/malattia ha portato alla formazione nel 2007 dello *Human Microbiome Project* (HMP) e nel suo corrispettivo consorzio europeo *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (Meta-HIT). Entrambi i progetti sono stati ideati con lo scopo di

caratterizzare in termini di composizione ed abbondanza i microrganismi che colonizzano i diversi distretti del corpo umano, sfruttando i progressi tecnologici nel campo del sequenziamento genetico e dell'analisi bioinformatica (2, 3).

I primi studi nel campo della caratterizzazione delle comunità microbiche si basavano su tecniche di amplificazione, sub-clonaggio e sequenziamento Sanger. Nonostante questi approcci risultino estremamente robusti, sono ad oggi considerati non più efficienti in termini di costi economici e tempi di risposta. La comunità scientifica è ormai comunemente orientata

Corrispondenza a: Elisa De Paolis, Laboratorio di Diagnostica Molecolare e Genomica, UOC di Chimica, Biochimica e Biologia Molecolare, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma, Italia. Largo A. Gemelli 1, 00168, Roma, Tel 0630154222, E-mail elisadepaolis88@gmail.com

Ricevuto: 28.01.2019

Revisionato: 25.03.2019

Accettato: 16.04.2019

Publicato on-line: 26.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.041

sull'utilizzo di tecnologie *high-throughput* di tipo molecolare (*Next Generation Sequencing*, NGS) per la caratterizzazione del microbiota. In particolare, l'analisi NGS di geni marker, tra cui il più popolare è il gene ribosomiale 16S (16S rRNA), ha permesso un notevole incremento delle conoscenze in questo campo (4).

Nell'ultima decade, molti studi hanno dimostrato la correlazione tra il microbiota e l'insorgenza ed il decorso di diverse patologie dell'uomo, suggerendo come lo studio approfondito della composizione microbica può avere importanti ripercussioni nella diagnosi della malattia e nel trattamento terapeutico (5). In tale scenario, i disordini dermatologici rappresentano uno dei campi di maggiore applicazione. Infatti, patologie dermatologiche comuni come la dermatite atopica (6), la dermatite seborroica (7), la psoriasi (8) e l'acne (9) sono state associate a specifici cambiamenti del microbiota cutaneo (i.e. disbiosi).

Il pemfigo ed il pemfigoide bolloso (BP) rappresentano le principali patologie bollose dell'uomo. Il termine pemfigo si riferisce ad un gruppo di rare patologie bollose autoimmuni della cute e delle mucose altamente invalidanti (10). Sono state identificate tre diverse forme cliniche di pemfigo, tra cui il pemfigo volgare (PV) è quella più frequente, con una incidenza annuale stimata allo 0,8-6,7 nuovi casi per milione (11). La manifestazione clinica a livello cutaneo e mucosale è legata a fenomeni di acantolisi derivanti dalla perdita di adesione intercellulare tra i cheratinociti. Il principale meccanismo patogenetico alla base di tale fenomeno consiste nella presenza di autoanticorpi specifici per componenti del desmosoma (Desmogleina 3, Dsg3). Il BP è invece a prevalente interessamento cutaneo, con raro coinvolgimento anche delle mucose. Come per il PV, anche nel caso del BP l'eziologia è autoimmune con autoanticorpi diretti verso componenti degli emidesmosomi (BP230 e BP180) (12). La diagnosi differenziale tra le due patologie bollose viene effettuata mediante ricerca in immunofluorescenza degli autoanticorpi. Solo recentemente è stato ipotizzato il coinvolgimento del microbiota cutaneo nella modulazione dello stato infiammatorio e della reazione autoimmune in patologie bollose come il BP e l'Epidermolisi Bollosa Acquisita (13, 14).

Lo scopo di questo studio preliminare è stato caratterizzare tramite tecnologia NGS il microbiota cutaneo, intestinale e della mucosa orale in pazienti affetti da PV e BP. Abbiamo inoltre confrontato i risultati ottenuti tra i due gruppi di pazienti, con l'intento di verificare la presenza di una composizione microbica peculiare a supporto di un'indagine differenziale tra le due patologie bollose.

METODI

Pazienti e campionamento

Nello studio sono stati inclusi 20 pazienti caucasici, di cui 12 affetti da PV e 8 affetti da BP (Tabella 1). Tutti i partecipanti sono stati arruolati nel Dipartimento di

Dermatologia dell'Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI)-IRCCS ed hanno sottoscritto un consenso informato di adesione al protocollo di studio. Lo studio è stato svolto in accordo con quanto previsto dalla Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996.

In relazione alla manifestazione della malattia ed alla reperibilità dei campioni, per ogni partecipante è stato prelevato almeno uno dei seguenti dei tipi di campione oggetto di analisi: feci, tampone di cute lesionale e tampone di mucosa orale lesionale (Tabella 1).

I partecipanti allo studio non hanno assunto terapie antibiotiche sistemiche, probiotici e fermenti lattici nei 30 giorni precedenti il prelievo. Le eventuali terapie topiche sono state sospese nei due giorni precedenti il prelievo.

I campioni di feci (10 per PV e 7 per BP) sono stati collezionati dagli stessi partecipanti allo studio in contenitori di raccolta sterili e fatti pervenire in laboratorio entro 24 ore dal campionamento. Aliquote di 300 mg sono state poi congelate a -80°C fino alla successiva analisi. I tamponi cutanei (3 sia per PV che per BP) e della mucosa orale (7 per PV) sono stati prelevati dalle zone lesionali utilizzando tamponi (COPAN SPA, Brescia, Italia) imbevuti di una soluzione sterile di campionamento (0,15 M NaCl e 0,01% Tween 20). I tamponi sono stati poi congelati a -80°C in una soluzione di conservazione (Tris-EDTA e 0,5% Tween 20) fino a successiva analisi. A causa della rarità dell'interessamento mucosale nei pazienti con BP e la conseguente difficoltà di arruolamento, i risultati ottenuti dall'analisi di questa tipologia di campioni nei pazienti con PV sono stati confrontati con campioni di controllo ($n=5$) estrapolati dal database dello HMP (15).

Estrazione del DNA batterico e sequenziamento

L'estrazione del DNA batterico dai campioni di tampone cutaneo e della mucosa orale è stata effettuata mediante l'utilizzo del kit QIAamp® DNA Microbiome (Qiagen, Hilden, Germany) in accordo con le istruzioni del produttore. I campioni di feci sono stati sottoposti all'estrazione del DNA tramite il kit QIAamp® PowerFecal® DNA (Qiagen, Hilden, Germany) secondo le indicazioni del produttore.

La qualità del DNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% mentre la quantità è stata determinata fluorometricamente tramite Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Il DNA estratto è stato poi conservato a -20°C fino alle successive analisi.

Il protocollo di sequenziamento del DNA ha previsto l'utilizzo del kit Microbiota solution A (Arrow Diagnostics, Genova, Italia) per l'amplificazione delle regioni ipervariabili V1-V3 del gene ribosomiale 16S. Le librerie così ottenute sono state sequenziate su piattaforma Illumina® MiSeq (Illumina, CA, US). I dati FastQ di sequenziamento sono stati analizzati utilizzando un software dedicato (SmartSeq, Novara, Italia) che ha permesso l'aggregazione delle sequenze ottenute in *Operational Taxonomic Unit* (OTU) e la successiva

Tabella 1

Caratteristiche della popolazione in analisi. La tabella indica i dati relativi ai pazienti arruolati nello studio, con riferimento alla tipologia di campioni analizzati.

Numero del caso	Sesso	Età	Diagnosi	Tipologia di campione		
				Tampone cutaneo	Tampone	Feci
1	M	48	PV	S	S	S
2	F	46	PV	N	S	S
3	F	80	PV	N	N	S
4	M	56	PV	S	N	S
5	F	39	PV	N	S	N
6	F	77	PV	N	S	S
7	M	43	PV	N	N	S
8	F	51	PV	N	S	N
9	F	57	PV	N	S	S
10	M	55	PV	N	S	S
11	M	38	PV	N	N	S
12	M	65	PV	S	N	S
13	F	84	BP	N	N	S
14	F	61	BP	N	N	S
15	F	83	BP	S	N	S
16	M	45	BP	N	N	S
17	M	88	BP	S	N	S
18	F	89	BP	N	N	S
19	M	47	BP	S	N	N
20	F	66	BP	N	N	S

M, Maschio; F, Femmina; PV, Pemfigo Volgare; BP, Pemfigoide Bolloso; S, Si; N, No.

classificazione tassonomica a livello di phyla e di specie.

Analisi statistica

I dati forniti nelle tabelle di aggregazione OTU sono stati rielaborati con lo scopo di ottenere una valutazione qualitativa e quantitativa delle caratteristiche tassonomiche (abbondanza relativa % e

presenza/assenza). Per la valutazione dei phyla della mucosa orale, i dati ottenuti dai pazienti affetti da PV sono stati confrontati con quelli estrapolati da database di controllo (15), come precedentemente descritto. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software STATA (StataComp. 2011) applicando la soglia di abbondanza relativa >5% e >3% per la valutazione dei

phyla e delle specie batteriche, rispettivamente. I risultati quantitativi ottenuti, espressi come mediana (p50) e valore minimo e massimo, sono stati comparati con il test non parametrico di Mann-Whitney ($p < 0,05$).

RISULTATI

I risultati dell'analisi ottenuta a livello di phyla sono mostrati in Tabella 2 come p50 e valore minimo e massimo dell'abbondanza relativa (%) per ciascuna delle tre tipologie di campione (feci, tampone cutaneo e tampone mucosale) nei tre gruppi di soggetti analizzati (PV, BP e controlli sani). Le differenze tra le abbondanze relative (%) dei diversi phyla identificati nei due gruppi di pazienti PV e BP sono risultate statisticamente non significative sia nel caso dei campioni di feci che nel caso dei campioni di tampone cutaneo. In particolare, nel caso dei campioni di feci, si è osservata una presenza bilanciata di Firmicutes e di Bacteroidetes tra i due gruppi di pazienti (rispettivamente 43,3% e 50,9% nel gruppo PV e 47,7% e 43,8% nel gruppo BP), con una minore quota di Proteobacteria. Viceversa, nel caso dei

campioni di cute, abbiamo riscontrato un netta prevalenza di Firmicutes (82,4% nel gruppo PV e 99,3% nel gruppo BP) rispetto ad altri phyla. Dal confronto tra le abbondanze relative (%) dei phyla identificati nei pazienti con PV e nei controlli sani, è infine emersa una significativa riduzione della quota di Bacteroidetes (7,2% nel gruppo con PV e 28,4% nel gruppo di controllo; $p = 0,0112$).

L'analisi della composizione microbica effettuata a livello di specie è mostrata in Figura 1. In particolare, nel pannello 1A sono mostrate le abbondanze relative (%) delle 10 specie più rappresentate nei campioni di feci nei due gruppi di pazienti. Analogamente, nel pannello 1B sono mostrati i risultati relativi alle specie più abbondanti nei campioni di cute. Come atteso, un'alta diversità di specie è emersa dalla caratterizzazione dei campioni di feci. La composizione microbica presente nei campioni di cute ha invece mostrato una netta prevalenza della specie *Staphylococcus* per entrambi i gruppi di pazienti. In particolare, mentre nei pazienti con BP è stata riscontrata una quasi totalità di popolazione microbica appartenente alle specie di *Staphylococcus*

Tabella 2

Abbondanza relativa (%) dei phyla in pazienti e controlli. La tabella indica i dati di abbondanza relativa (>5%) dei phyla identificati nei gruppi di pazienti e nel gruppo di controllo. I dati sono mostrati come mediana (p50) e valore minimo e massimo, suddivisi per tipologia: microbiota intestinale, microbiota cutaneo e microbiota della mucosa orale. Statisticamente significativo è il confronto relativo al microbiota della mucosa orale dei pazienti con PV e dei controlli (Bacteroidetes, $p = 0,0112$).

		Firmicutes (%)	Bacteroidetes (%)	Proteobacteria (%)	Actinobacteria (%)	Fusobacteria (%)
		p50 (min-max)	p50 (min-max)	p50 (min-max)	p50 (min-max)	p50 (min-max)
Microbiota intestinale	PV (n=10)	43,3 (31,8-75,0)	50,9 (20,5-66,6)	10,3 (5,7-21,4)	-	-
	BP (n=7)	47,7 (38,8-65,3)	43,8 (33,0-50,9)	7,8 (5,2-12,7)	10,4*	-
	p	0,1719	0,2046	0,4795	-	-
Microbiota cutaneo	PV (n=3)	82,4 (82,1-83,2)	-	-	17,4 (15,8-17,5)	-
	BP (n=3)	99,3 (55,7-99,9)	-	13,4*	30,7*	-
	p	0,5127	-	-	0,5066	-
Microbiota mucosa orale	PV (n=7)	45,5 (27,1-72,6)	7,2 (5,7-12,6)	15,2 (5,1-23,9)	5,5 (2,8-27,0)	28,0 (10,4-41,6)
	CTRL (n=5)	39,6 (32,3-73,4)	28,4 (7,3-38,5)	13,3 (10,5-42,6)	2,4 (1,4-5,3)	8,5 (1,9-13,2)
	p	0,6847	0,0112	0,3718	0,1675	0,0882

*singola osservazione

PV, Pemfigo Volgare; BP, Pemfigoide Bolloso.

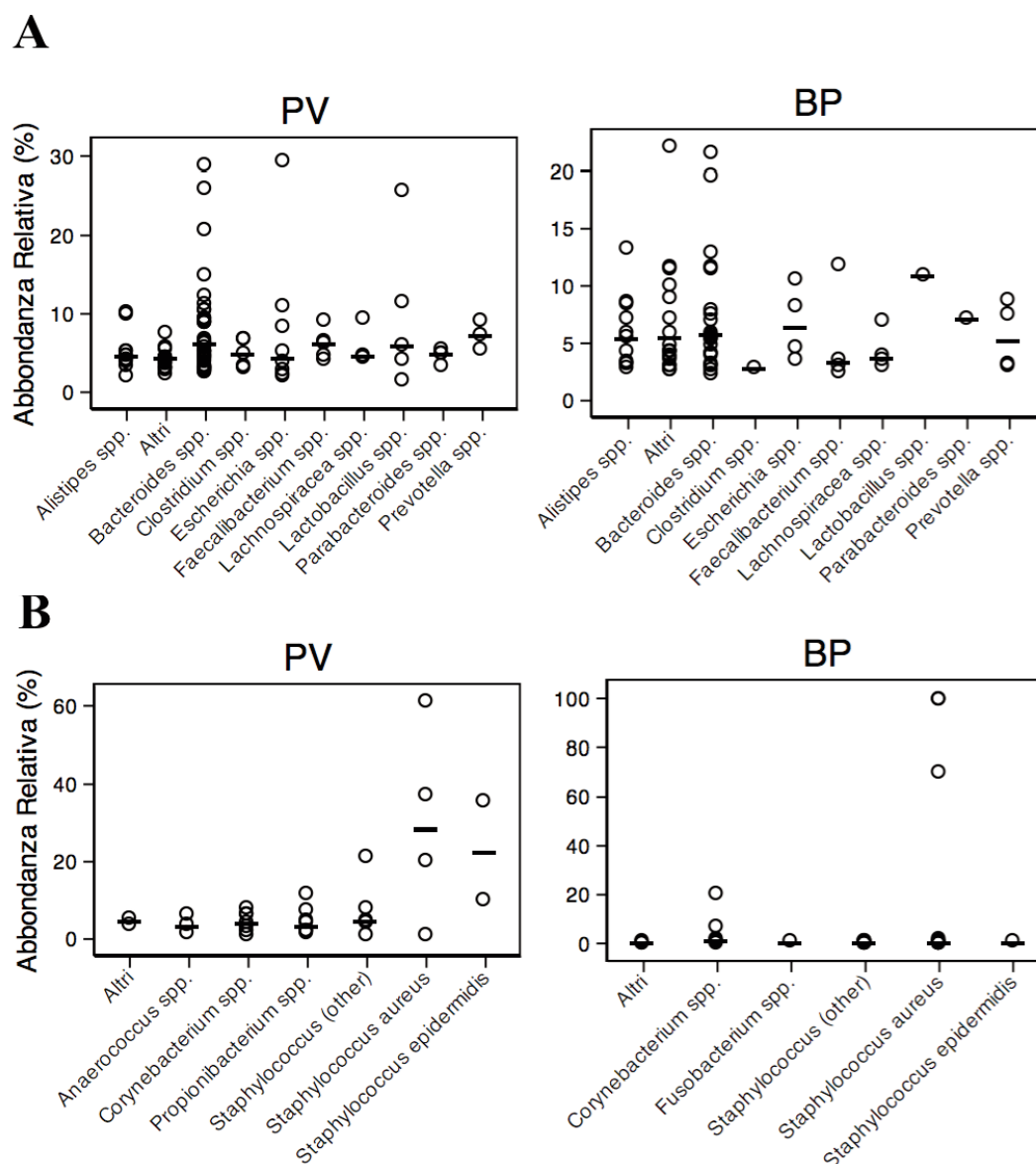


Figura 1

Abbondanza relativa (%) delle specie. La figura mostra i valori di abbondanza relativa (%) e mediana (linea orizzontale) delle 10 specie più rappresentate nei campioni di feci (1A) e nei tamponi cutanei (1B) nel gruppo di pazienti affetti da pemfigo volgare (PV) e pemfigoide bolloso (BP).

aureus ed, in misura minore, anche di *Corynebacterium*, nei pazienti con PV abbiamo riscontrato la presenza sia di *Staphylococcus aureus* che di *Staphylococcus epidermidis*.

DISCUSSIONE

Le alterazioni del microbiota residente in un determinato distretto sono associate ad un numeroso gruppo di patologie. In particolare, la disbiosi a livello cutaneo sembra avere un forte impatto sullo sviluppo di

malattie dermatologiche di tipo non infettivo come la dermatite atopica (6), la psoriasi (8), l'acne (9) ed altre comuni patologie (16, 17). Lo scopo di questo studio preliminare è stato quello di caratterizzare il microbiota intestinale, cutaneo e della mucosa orale in pazienti affetti da PV e BP, due rare patologie dermatologiche autoimmuni. In letteratura sono presenti pochi dati sul ruolo del microbiota in questa tipologia di malattie dermatologiche, con unici riferimenti al BP (13) e all'Epidermolisi Bollosa Acquisita (14).

Nel nostro studio, i due gruppi di pazienti sono stati

confrontati in termini di composizione microbica, con l'intento di ricercare differenze significative tra le due patologie bollose.

La cute di soggetti sani è caratterizzata da quattro phyla prevalenti: Actinobacteria (52%), Firmicutes (24%), Proteobacteria (17%) e Bacteroidetes (7%) (18). Dalla valutazione del microbiota presente a livello della cute lesionale dei pazienti analizzati è emersa una bassa diversità, con la prevalenza del phylum Firmicutes sia nel gruppo BP che nel gruppo PV. Tale risultato conferma quanto già riportato per i pazienti con BP (13). Inoltre, una diminuzione della diversità del microbiota cutaneo è stata associata anche ad altre patologie dermatologiche come la dermatite atopica (19). La valutazione a livello di specie ha evidenziato una netta prevalenza del gruppo *Staphylococcus* nella cute lesionale in entrambi i gruppi di pazienti, con particolare riferimento alla specie *S. aureus* nel gruppo con BP. Sebbene la specie *S. epidermidis* sia prevalente nella cute dei soggetti sani, il coinvolgimento di altre specie del medesimo gruppo è stato dimostrato in diverse patologie dermatologiche, anche di tipo bolloso come l'Epidermolisi Bollosa Acquisita (20). Nel caso invece della dermatite atopica, è stato osservato che l'abbondanza relativa di *S. aureus* aumenta con il protrarsi dell'infiammazione cutanea e la severità della malattia (21). Come documentato in patologie dermatologiche con compromissione della barriera cutanea e dell'integrità immunologica, anche nei pazienti oggetto di studio potrebbe essere ipotizzato un coinvolgimento di questo gruppo di batteri nell'eziopatogenesi (16).

Per quanto riguarda la valutazione del microbiota della mucosa orale, non è stato possibile effettuare un confronto diretto tra le due patologie a causa della rarità del coinvolgimento delle mucose nei pazienti affetti da BP. Da una primissima analisi tra pazienti PV ed un gruppo di controllo è emerso un significativo decremento dell'abbondanza relativa (%) del phylum Bacteroidetes ($p=0,0112$) nel microbiota della mucosa orale dei pazienti affetti da PV. È interessante sottolineare come i pazienti affetti da PV con coinvolgimento della mucosa orale manifestino un peculiare segno di malattia, utile anche alla diagnosi stessa, rappresentato da una tipica alitosi. Possiamo ipotizzare che uno sbilanciamento del normale microbiota residente a livello orale possa essere la causa di questa manifestazione e che possa, di conseguenza, diventare oggetto di interesse sia in fase diagnostica che terapeutica. Complessivamente, l'analisi del microbiota intestinale ha evidenziando una composizione bilanciata dei phyla Firmicutes e Bacteroidetes, con una minore quota di Proteobacteria, senza differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti. In seguito all'analisi di confronto tra i due gruppi di pazienti, il protocollo di studio definitivo includerà l'arruolamento di gruppi di controllo. In questa fase preliminare tale approccio è stato applicato unicamente all'analisi del microbiota orale in linea con gli obiettivi e con il disegno sperimentale dello studio pilota.

In conclusione, questo studio preliminare

rappresenta un primo approccio investigativo riguardante il coinvolgimento del microbiota nelle patologie dermatologiche bollose. Nei pazienti affetti da PV e BP è importante valutare nuovi scenari diagnostici e di ricerca sulle basi fisiopatologiche di malattia, tenendo anche in considerazione la difficoltà di remissione e la cronicità della patologia altamente invalidante. I risultati mostrati presentano diversi limiti, ad oggi oggetto di valutazione. Il principale di questi è rappresentato dalla bassa numerosità della popolazione analizzata che può influenzare la generalizzazione dei risultati ottenuti. I risultati emersi dal test statistico potrebbero risentire della bassa numerosità campionaria e di conseguenza verranno confermati su una casistica più ampia di pazienti e controlli. Tale limite è principalmente dovuto alla difficoltà nel reclutare un numero cospicuo di pazienti affetti da questi rari disordini dermatologici. Ad oggi, i dati presentati sono in via di comparazione con altri parametri clinici, come gli indici di malattia, le terapie in atto e con il decorso della malattia stessa, con lo scopo di espandere le conclusioni e correlare la caratterizzazione del microbiota con la manifestazione della malattia nel tempo.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, et al. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* 2012;70 Suppl 1:S38-44.
2. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature* 2012;486(7402):215-21.
3. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009;19:2317-23.
4. Castelino M, Eyre S, Moat J, et al. Optimisation of methods for bacterial skin microbiome investigation: primer selection and comparison of the 454 versus MiSeq platform. *BMC Microbiol* 2017;17:23.
5. Blum HE. The human microbiome. *Adv Med Sci* 2017;62:414-20.
6. Williams MR, Gallo RL. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;15:65.
7. Tanaka A, Cho O, Saito C, et al. Comprehensive pyrosequencing analysis of the bacterial microbiota of the skin of patients with seborrheic dermatitis. *Microbiol Immunol* 2016;60:521-6.
8. Sanchez DA, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The skin microbiome: is there a role in the pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis? *J Drugs Dermatol* 2015;14:127-30.
9. Dreno B, Martin R, Moyal D, et al. Skin microbiome and acne vulgaris: *Staphylococcus*, a new actor in acne. *Exp Dermatol* 2017;26:798-803.
10. Pollmann R, Schmidt T, Eming R, et al. Pemphigus: a comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018;54:1-25.
11. Vodo D, Sarig O, Geller S, et al. Identification of a functional risk variant for pemphigus vulgaris in the ST18 gene. *PLoS Genet* 2016;5;12:e1006008.

12. Hammers CM, Stanley JR. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol* 2016;23;11:175-97.
13. Miodovnik M, Kunstner A, Langan EA, et al. A distinct cutaneous microbiota profile in autoimmune bullous disease patients. *Exp Dermatol* 2017;26:1221-7.
14. Ellebrecht CT, Srinivas G, Bieber K, et al. Skin microbiota-associated inflammation precedes autoantibody induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Autoimmun* 2016;68:14-22.
15. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One* 2014;9(6).
16. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:143-55.
17. Picardo M, Ottaviani M. Skin microbiome and skin disease: the example of rosacea. *J Clin Gastroenterol* 2014;48 Suppl 1:S85-6.
18. Weyrich LS, Dixit S, Farrer AG, et al. The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease. *Australas J Dermatol* 2015;56:268-74.
19. Kong HH, Oh J, Deming C, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res* 2012;22:850-9.
20. Srinivas G, Möller S, Wang J, et al. Genome-wide mapping of gene-microbiota interactions in susceptibility to autoimmune skin blistering. *Nat Commun* 2013;4:2462.
21. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature* 2018;553(7689):427-36. Erratum in: *Nature* 2018;21;555(7697):543.

La metilazione del DNA nella diagnostica: stato dell'arte e prospettive

Andrea Fuso¹, Marco Lucarelli^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma

²Istituto Pasteur Fondazione Cenci Bolognetti, Sapienza Università di Roma

ABSTRACT

DNA methylation in diagnostics: state of the art and perspectives. DNA methylation is the most known and studied among the epigenetic modifications; these are chemical modifications occurring on DNA or histone proteins, able at modifying the transcriptional efficiency of genes. DNA methylation consists in the binding of a methyl group (-CH₃) on the carbon n. 5 of a cytosine moiety. Recently, it has been demonstrated that methylated cytosines can be further modified to hydroxy-methyl-cytosines, but it is still unclear whether this transformation is just a demethylation intermediate or it can retain the functional role of an independent epigenetic modification. At first, DNA methylation has been studied for its physiological role in the regulation of gene expression during the different stages of the cell life, particularly during differential and embryogenesis. Then, during the last thirty years, it has been shown that the epigenetic modifications, particularly DNA methylation, are involved in the onset and progression processes of some pathologies. The role of DNA methylation in cancer processes is known since a long time, whereas only recently it becomes evident that this epigenetic modification is a component of some degenerative and aging-associated pathologies, particularly in neurodegenerative and inflammatory processes. Due to the incredible technical advances developed in the last years, it is now possible to study in detail the methylation pattern of a gene sequence with single cytosine resolution, rapidly and with high accuracy and precision. Besides allowing the rapid evolution of our knowledge of the physio-pathological states in which DNA methylation has a functional role, this favourable condition also allows us to consider the possible use of DNA methylation as diagnostic biomarker in different pathologies.

INTRODUZIONE

La metilazione del DNA è regolata, a livello biochimico, dagli enzimi e dagli intermedi metabolici che costituiscono un *pathway* definito con termine inglese *one-carbon metabolism* (1). Si tratta di un complesso pathway biochimico, conosciuto anche come "ciclo dell'omocisteina" regolato, fra gli altri, dalla presenza di alcune vitamine del gruppo B (Folato, B12 e B6) e dalla colina. Fra gli intermedi del ciclo, la S-adenosilmetionina è il donatore di metili in tutte le reazioni catalizzate dalle DNA metiltransferasi (DNMTs). Oltre che trasferire i residui metilici sulle citosine del DNA, la S-adenosilmetionina regola anche l'attività di questi enzimi. Pertanto si intuisce facilmente come eventuali alterazioni di questo ciclo metabolico possano causare aberrazioni nei livelli di metilazione del DNA, che a loro volta, potrebbero avere conseguenze patologiche (2-4). L'attività enzimatica delle DNMTs è distinguibile in due reazioni: la metilazione di

mantenimento e la metilazione *ex novo*. La prima, catalizzata dalla DNMT1, agisce durante la replicazione cellulare, quando la molecola di DNA, metilata sui residui di citosina seguiti da una guanina (CpG), viene duplicata dando origine ad una molecola emimetilata, in cui cioè solo il filamento stampo conserva il gruppo metilico. La DNMT1 agisce a questo livello, riconoscendo le molecole emimetilate ed usandole come "stampo" per mutare il filamento di DNA di nuova sintesi e mantenere così il pattern di metilazione della cellula madre. L'attività *ex novo*, catalizzata dalle DNMT3a e 3b, può invece manifestarsi anche in assenza di replicazione cellulare e di uno "stampo" emimetilato.

Poiché la metilazione, come tutte le modificazioni epigenetiche, è reversibile, esistono anche funzioni di demetilazione. La demetilazione passiva avviene durante la replicazione cellulare ed in assenza di attività metiltransferasica di mantenimento: man mano che le cellule si replicano, crescerà il numero di molecole di

Corrispondenza a: Andrea Fuso, Dip. di Medicina Sperimentale, c/o Dip. di Chirurgia "P. Valdoni", Via Antonio Scarpa, 16, 00161 Roma, Tel +390649766603, E-mail andrea.fuso@uniroma1.it

Ricevuto: 05.06.2019

Revisionato: 11.07.2019

Accettato: 27.07.2019

Pubblicato on-line: 02.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.064

DNA non metilate rispetto a quelle metilate. La demetilazione attiva consiste invece nella rimozione diretta del gruppo metilico in assenza di replicazione cellulare e duplicazione del DNA. Sembra ormai accertato che questo passaggio sia mediato dalle proteine *Ten-eleven Translocation methylcytosine dioxygenase* (TET) che inducono l'idrossilazione della metil-citosina. L'idrossimetil-citosina così formata viene ulteriormente ossidata a formil-citosina e carbossil-citosina con successiva deaminazione idrolitica e sostituzione con una citosina non metilata, risultando al netto in una reazione di demetilazione. Data la rapidità di trasformazione, rispetto alla relativa stabilità della metilazione, l'idrossimetilazione e le successive modificazioni ossidative ancora non hanno trovato un posto certo fra le modificazioni epigenetiche e potrebbero rivelarsi solo degli intermedi della demetilazione, benché siano allo studio per il loro possibile ruolo nella regolazione dell'espressione genica. Il ruolo della metilazione del DNA nel silenziamento genico è invece conosciuto da tempo ed è basato sulla capacità di questa modificazione di impedire il legame al DNA dei fattori di trascrizione. Questa capacità passa attraverso il reclutamento di specifiche proteine che riconoscono il DNA metilato (*methyl binding proteins*) e che possono inibire direttamente il legame dei fattori di trascrizione competendo per i siti di legame, oppure possono agire inducendo un silenziamento più stabile tramite la deacetilazione degli istoni e la conseguente compattazione cromatinica (5).

Eseguendo una ricerca sulla banca dati PubMed, si può notare come gli articoli scientifici relativi a studi epigenetici abbiano visto un incremento incredibile negli ultimi 20 anni, passando da circa 300 articoli pubblicati nel 2000 a oltre 10 000 articoli nel 2018. L'aumento nell'interesse per le modificazioni epigenetiche trova una ragione in due motivi principali: l'evoluzione tecnica che permette di studiare molto più nel dettaglio le modificazioni epigenetiche e l'evidenza che queste sono coinvolte in molte patologie.

LE TECNICHE PER LO STUDIO DELLA METILAZIONE

Negli ultimi anni, i progressi nelle tecniche biochimiche utilizzate per lo studio delle modificazioni epigenetiche sono stati impressionanti, particolarmente per quel che concerne lo studio della metilazione del DNA. Un riassunto schematico delle principali tecniche è riportato nella Tabella 1. In origine era possibile studiare la presenza di 5-metil-Citosina (5mC) solamente a livello genomico globale, tramite idrolisi del DNA ed analisi cromatografica (6). Benché migliorata con l'avvento dell'elettroforesi capillare, questo tipo di analisi è limitata dalla gran quantità di materiale di partenza necessario e dal fatto che le informazioni ottenute non permettono di determinare la metilazione di specifiche regioni del DNA, cosa invece necessaria per capirne la funzione. Oggi sono comunemente usati,

da soli o in combinazione, tre approcci, che risultano quindi in un ampio pannello di saggi che permettono di studiare vari aspetti della metilazione del DNA a livello sequenza-specifico e con risoluzione sulla singola citosina: digestione del DNA con endonucleasi metilazione-sensibili, modificazione con bisolfito di sodio seguita da amplificazione in Polymerase Chain Reaction (PCR) e purificazione della frazione metilata con anticorpi specifici (7).

Fra queste, la modificazione con bisolfito, che converte selettivamente le citosine non metilate in uracili, è sicuramente la più utilizzata e alla base delle analisi più complesse (8-10). Queste tecniche possono essere anche combinate con approcci su scala genomica con risoluzione a singola citosina, come fingerprint o microarrays, fornendo l'opportunità di analizzare sequenze multiple (analisi *genome-wide*) e investigare possibili nuovi marcatori.

Uno dei primi approcci usati per l'analisi della metilazione *genome-wide* è stato il *restriction landmark genomic scanning* (RLGS), in cui il DNA genomico è digerito con una endonucleasi metilazione-sensibile, marcato al sito di taglio e frazionato per dimensione (11). Successivamente, il DNA frazionato è ulteriormente digerito con un'altra endonucleasi e separato. Si ottiene così un profilo bi-dimensionale con migliaia di segnali che rappresentano le sequenze non metilate e che permette un confronto con altri profili per individuare siti di metilazione differenziale. I segnali individuati a seguito del confronto possono essere isolati ed identificati.

Un altro metodo basato sull'uso di endonucleasi metilazione-sensibili è il *Methylated CpG-island Amplification* (MCA) (12). Il DNA viene digerito con l'enzima *SmaI* (CCCGGG), che taglia i siti non-metilati lasciando estremità pari, e successivamente con l'isoschizomero *XmaI*, che taglia i siti metilati lasciando estremità protrudenti cui viene legato uno specifico adattatore. La sequenza dell'adattatore viene usata per il riconoscimento da parte dei primers nella successiva reazione di PCR. Questa tecnica è simile a quella denominata *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS) in cui la prima digestione viene effettuata con un enzima non sensibile alla metilazione (generalmente *MspI* che riconosce la sequenza CCGG); sul sito di taglio viene quindi legato un adattatore e il DNA frammentato (arricchito in siti CpG per via dell'endonucleasi utilizzata) viene modificato con bisolfito per identificare i siti di metilazione. Per ottimizzare la parte più complessa, ovvero l'identificazione differenziale di sequenze metilate attraverso la *representational difference analysis* (RDA), la tecnica è spesso associata ad analisi su microarray. Alternativamente, l'approccio basato su MCA può essere usato nella *Amplification of intermethylated sites* (AIMS) in cui i prodotti di PCR sono risolti in gel di poliacrilammide così da generare un profilo di bande che rappresenta il metiloma della cellula (13).

Tabella 1*Tecniche per lo studio della metilazione*

Tecnica	Sigla	Breve descrizione	Riferimenti
Modificazione con bisolfito		DNA modificato con bisolfito che trasforma le citosine NON-metilate in uracili. Vari metodi di analisi finale.	8-10
Restriction Landmark Genomic Scanning	RLGS	DNA digerito con endonucleasi metilazione-sensibile, marcato e frazionato, ulteriormente digerito con ulteriore endonucleasi e separato. Si genera un profilo bi-dimensionale delle sequenze non metilate, confrontabile con altri profili per individuare metilazione differenziale.	11
Methylated CpG-island Amplification	MCA	DNA digerito con endonucleasi <i>SmaI</i> (CCCGGG), che taglia i siti non-metilati lasciando estremità pari, e successivamente con l'isoschizomero <i>XmaI</i> , che taglia i siti metilati lasciando estremità protrudenti cui viene legato uno specifico adattatore usato nella successiva reazione di PCR.	12
Reduced Representation Bisulfite Sequencing	RRBS	DNA digerito con endonucleasi <i>MspI</i> , non sensibile alla metilazione (CCGG); sul sito di taglio viene legato un adattatore con conseguente arricchimento in siti CpG. Il DNA frammentato viene modificato con bisolfito.	13
Representational Difference Analysis	RDA	Ottimizza l'identificazione differenziale di sequenze metilate ottenute con MCA grazie all'associazione con analisi su microarray.	13
Amplification of Intermethylated Sites	AIMS	Basato su MCA con i prodotti di PCR risolti in gel di poliacrilammide; genera un profilo di bande che rappresenta il metiloma	13
Microarrays	Litografici (Affymetrix) Litografici adattivi (NimbleGen) Inkjet (Agilent) Beadarray (Illumina)	In tutti questi saggi, gli arrays contengono un certo numero di sequenze CpG conosciute e vengono ibridizzati con un campione arricchito in sequenze CpG-dense ottenuto dopo digestione del DNA genomico con endonucleasi metilazione-sensibili. In alternativa arrays per l'uso con DNA modificato con bisolfito spottati con oligonucleotidi specifici per le versioni metilate o non-metilate delle sequenze di interesse. Il rapporto fra siti metilati e non-metilati è ottenuto paragonando l'ibridazione dei due diversi oligonucleotidi.	14-17
Chromatin Immuno-Precipitation	ChIP-on-chip	Ibridizzazione del DNA immunoprecipitato con un anticorpo anti-CpG-methyl-binding domains (MBDs) su un microarray di CpGs islands	18
Methyl-DNA Immuno-Precipitation	MeDIP	Immunoprecipitazione diretta con un anticorpo anti-5mC; più efficiente sulle isole CpG	19
Comparative Genomic Hybridization	CGH	Analisi differenziale della metilazione nelle patologie basata sulla Comparative Genomic Hybridization, dopo modificazione con bisolfito	20
Quantitative Analysis of Methylated Alleles	QAMA	Software per l'analisi differenziale della metilazione.	20

I microarrays sono utilizzati in diversi metodi per lo studio della metilazione del DNA a livello genomico (14-15), grazie alla messa in commercio di specifici arrays di diverso tipo: litografici (Affymetrix; S. Clara, CA, USA), litografici adattivi (NimbleGen-Roche; Basel, Switzerland), *inkjet* (Agilent; S. Clara, CA, USA) e *beadarray* (Illumina; S. Diego, CA, USA). In tutti questi saggi, gli arrays contengono un certo numero di sequenze CpG conosciute e vengono ibridizzati con un campione arricchito in sequenze CpG-dense (CpG islands) ottenuto dopo digestione del DNA genomico con endonucleasi metilazione-sensibili. Sono stati disegnati anche arrays per l'uso con DNA modificato con bisolfito. In questo caso la strategia standard prevede l'uso di arrays che portano legati oligonucleotidi specifici per le versioni metilate o non-metilate delle sequenze di interesse. Il rapporto fra siti metilati e non-metilati è ottenuto paragonando l'ibridazione dei due diversi oligonucleotidi per ciascun sito (16-17).

Sono state messe a punto anche delle tecniche per lo studio della metilazione basate sull'immunoprecipitazione mediante un approccio ChIP-on-chip, ad esempio ibridizzando il DNA immunoprecipitato con un anticorpo che riconosce dei CpG-methyl-binding domains (MBDs) su un microarray di CpGs islands (18). È stata anche sviluppata una nuova tecnologia di purificazione del DNA metilato, maggiormente efficiente sulle isole CpG, basata sull'immunoprecipitazione diretta (*methyl-DNA immunoprecipitation*, MeDIP) con un anticorpo anti-5mC (19).

Infine, sembra molto promettente il recente approccio basato sulla *comparative genomic hybridization* (CGH) e la *quantitative analysis of methylated alleles* (QAMA), soprattutto per quanto riguarda l'analisi differenziale della metilazione nelle patologie (20).

LE PATOLOGIE EPIGENETICHE

Per fare un parallelo con la frequenza di pubblicazioni inerenti l'epigenetica, nel 2000, per pochissime patologie umane veniva riportata un'associazione certa con modificazioni epigenetiche, specificamente la metilazione del DNA: i tumori, la sindrome dell'X fragile, la sindrome *Immunodeficiency, Centromere instability and Facial abnormalities* (ICF) e la sindrome di Rett. La metilazione del DNA può essere coinvolta nella tumorigenesi in differenti modi, principalmente in quanto la 5mC è un *hotspot* mutazionale e anche perché variazioni anomale della metilazione, ovvero la ipermetilazione di oncosoppressori e la ipometilazione di oncogeni, possono contribuire all'insorgenza di un fenotipo cellulare tumorale (21). La sindrome dell'X Fragile è caratterizzata da ritardo mentale causato dall'espansione e relativa ipermetilazione della tripletta CGG nella regione non trascritta al 5' del gene *fragile X mental retardation-1* (FMR1), con conseguente

repressione del gene. Le sindromi ICF e Rett sono caratterizzate da mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nella regolazione della metilazione del DNA (22-23). La ICF è caratterizzata da estrema suscettibilità alle infezioni (per immunodeficienza), dismorfismi, difetti di crescita e ritardo psicomotorio causate da mutazioni del gene *DNMT3b*, che codifica per la DNA metiltransferasi *de novo*. La Rett è una patologia neurologica associata a disfunzioni cognitive e ritardo nello sviluppo cerebrale causate da mutazioni nel gene *MeCP2*, che codifica per una *Methyl-CpG-binding protein*.

Oggi sappiamo che alterazioni della metilazione del DNA sono associate ad un gran numero di patologie e sono il risultato di differenti meccanismi. Molte patologie associate a livelli di metilazione aberranti, ad esempio, mostrano alterazioni dell'imprinting basate sulla metilazione. Fra questi vale la pena citare: le sindromi di Angelman, di Silver-Russell, di Prader-Willi e di Beckwith-Wiedemann, il diabete, la schizofrenia e le sindromi autistiche (24). Emerge di recente come anche molte patologie legate all'invecchiamento abbiano una base, o almeno una componente, epigenetica. Fra queste vanno ovviamente annoverate anche i tumori ed il diabete, ma in particolare si fa riferimento a patologie neurodegenerative quali la malattia di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) e la demenza frontotemporale (FTD) (25). In molti di questi casi, è stato evidenziato come le alterazioni della metilazione del DNA possano essere indotte in maniera indipendente dall'imprinting genomico ed essere piuttosto conseguenze di fattori ambientali che includono lo stress fisico e mentale, le deficienze nutrizionali, l'esposizione ad inquinanti o specie chimiche (4, 26, 27). L'associazione fra stimoli ambientali e modificazioni epigenetiche è anche molto evidente nel caso di patologie con base autoimmune, fra cui ad esempio il Lupus Eritematoso Sistemico (SLE) e l'Artrite Reumatoide (RA), in cui sono state evidenziate alterazioni della metilazione sequenza-specifiche in geni coinvolti nella funzione immunitaria (28).

Anche nel caso delle patologie cardiovascolari, è stato recentemente dimostrato che la metilazione del DNA può giocare un ruolo in quanto coinvolta nell'omeostasi delle cellule muscolari lisce e di quelle endoteliali. È noto che alterazioni nella proliferazione, migrazione, differenziamento ed apoptosi di queste cellule sono responsabili di condizioni patologiche associate a malattie cardiovascolari come l'aterosclerosi, l'ipertrofia cardiomiocitaria e l'infarto. Pertanto è possibile ipotizzare che modificazioni epigenetiche, indotte dall'ambiente e in primo luogo dalle abitudini nutrizionali (29), possano essere direttamente coinvolte nell'insorgenza delle patologie cardiovascolari.

Nella maggior parte dei casi elencati è stato possibile individuare alterazioni della metilazione a carico di specifici geni associati ad una o più patologie. In alcuni, inoltre, le alterazioni sono dovute a mutazioni a carico di

geni che codificano per fattori della metilazione. Ad esempio mutazioni nella DNA metiltransferasi 1 (DNMT1) che causano perdite di funzione dell'enzima e conseguente alterazione dei profili di metilazione, sono responsabili dell'insorgenza di forme ereditarie di neurodegenerazione centrale e periferica fra cui demenza, neuropatia degli organi di senso, perdita dell'udito, atassia cerebellare e narcolessia (30). Anche l'alterazione dell'espressione o delle funzioni delle DNA metiltransferasi può essere associata alla neurodegenerazione. Ad esempio, l'overespressione di DNMT3a induce neurodegenerazione e apoptosi cellulare in pazienti con ALS (31).

Il gene *Frataxin* porta la caratteristica ripetizione GAA responsabile dell'insorgenza dell'Atassia di Friederick, ma è stato anche dimostrato che l'espressione del gene mutante è regolata dal pattern di metilazione in relazione all'età di insorgenza e alla severità del fenotipo (32).

Il gene *Ataxin-2* è coinvolto in un'altra forma di atassia, l'Atassia Spinocerebellare di tipo 2. In questo caso la ripetizione CAG del gene mutante è responsabile solo in parte della grande differenza di fenotipi riscontrati; anche in questo caso la metilazione del gene ne regola l'espressione nonché la gravità del fenotipo e l'età di insorgenza (33). Questo gene è coinvolto anche in altre patologie, ovvero PD, ALS e FTD ed è quindi possibile ipotizzare che sia responsabile almeno in parte della componente epigenetica associata a queste malattie. Nelle forme sporadiche di PD, la componente epigenetica si manifesta anche con l'alterazione della metilazione del gene *SNCA*: il promotore è ipometilato nella corteccia, nella substantia nigra e nel putamen di pazienti affetti da PD. Altri loci associati al rischio di insorgenza di PD sono stati trovati differenzialmente metilati ed espressi nella corteccia e nel cervelletto (*PARK16*, *GPNMB*, *ST1B*) (34).

Nell'ambito delle malattie neurodegenerative, l'AD è sicuramente quella più studiata a causa della sua diffusione e del relativo peso clinico e socio-economico conseguente; inoltre, l'AD è anche paradigmatica in quanto la sua eziologia altamente multifattoriale chiama in causa una componente epigenetica (35-36). Il nostro gruppo di ricerca, ad esempio, ha dimostrato che il gene *Presenilin1* (*PSEN1*), che codifica per una delle proteasi responsabili della formazione del peptide beta-amiloide caratteristico dell'AD, è modulato da metilazione in un modello murino di neurodegenerazione (37) e che il promotore risulta differenzialmente metilato nel cervello e nel sangue di pazienti AD rispetto ai controlli (dati in pubblicazione).

BIOMARCATORI EPIGENETICI

Nonostante siano ormai state descritte molte regioni del DNA metilate in maniera differente nei pazienti rispetto ai controlli, per alcuni di questi loci è sicuramente necessario un ulteriore approfondimento per capire:

quanto la metilazione differenziale sia confermata su un gran numero di pazienti e quindi caratterizzante e se l'associazione individuata sia funzionalmente associata alla patologia. Nel momento in cui queste condizioni saranno confermate, si potrà dunque pensare che la metilazione differenziale di specifici residui di citosina di un dato gene/promotore possa essere utilizzata come marcatore biologico nella pratica clinica. L'uso della metilazione sequenza-specifica come marcatore biologico ha le premesse per essere utilizzato sia come marcatore per la diagnosi della malattia sia, nel caso in cui vengano applicate anche "terapie epigenetiche", come marcatore di progressione e di efficacia del trattamento.

Anche in questo caso, quello che sembra essere il primo possibile campo di applicazione è rappresentato dalle patologie tumorali in cui è stata evidenziata l'ipermetilazione del promotore di geni oncosoppressori. In questi casi, non solo uno specifico pattern di metilazione può essere facilmente misurato e fornire così uno strumento diagnostico precoce, ma può anche costituire una risorsa molto utile per caratterizzare il sottotipo tumorale, l'aggressività e la risposta al trattamento (38). L'alterazione del pattern di metilazione osservato nei tumori è generalmente caratterizzata da ipometilazione globale associata ad ipermetilazione di geni specifici (ovvero i sopra citati oncosoppressori metilati nelle regioni dei promotori) che sono quelli che costituiscono i biomarcatori epigenetici più promettenti e spesso riflettono il potenziale metastatico e la sensibilità alla terapia. Per caratterizzare questi patterns, i metodi basati sull'amplificazione in PCR del DNA modificato con bisolfito di sodio sono generalmente riconosciuti e accettati come i più sensibili e specifici dal punto di vista analitico per studiare la metilazione del DNA a livello di singoli loci. Tali metodi sono oggi complementati da tecniche recenti come ad esempio la *Methylation-specific fluorescent amplicon generation* (MS-FLAG), la *Methylation-sensitive high-resolution melting* (MS-HRM) e la *Sensitive melting analysis after real-time methylation-specific PCR* (SMART-MSP). Fra queste la HRM, che sfrutta la differente temperatura di dissociazione di un amplicone in base alla presenza di coppie CG, caratteristiche del DNA metilato dopo modificazione con bisolfito, è di particolare interesse come strumento diagnostico per via del costo contenuto (39-40).

Alcuni di questi loci sono già in uso nella diagnostica dei tumori; ad esempio la metilazione del gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) è riconosciuta come il marcatore prognostico/predittivo per il glioblastoma benché non sia ancora un'analisi molto diffusa nella gestione del paziente (41). Però, in generale, nonostante le numerose evidenze che legano l'alterazione della metilazione a livello gene-specifico con l'insorgenza o la progressione tumorale, ancora pochissimi geni sono utilizzati come biomarcatori tumorali nella pratica della biochimica clinica. Alcuni geni che mostrano anomalie di metilazione in specifici tipi di tumore solido (colon, pancreas, prostata, vescica,

mammella e ovario) sono comunque ben caratterizzati e catalogati e potrebbero essere utilizzati come biomarcatori dando il via a screening basati sull'analisi di metilazione non solo in biopsie fissate in paraffina, ma anche da prelievi di sangue o urine (42) laddove l'alterazione della metilazione di uno specifico gene sia sistemica o dove ci siano cellule tumorali presenti nei fluidi corporei. Alcuni dei principali marcatori già in uso nella pratica clinica sono riportati in alcune recenti rassegne (43-46). Fra questi, *ALX4*, *FBN2*, *HLTF*, *P16*, *TMEFF1* e *VIM* ipermetilati sono associati ad una prognosi negativa, *APC*, *NEUROG1*, *RASSF1A*, *RASSF2A*, *SDC2*, *SEPT9*, *TAC1* e *THBD* ipermetilati sono stati individuati negli stadi precoci del cancro coloretale mentre *P16* e *TFPI2* sono associati con le recidive di questo tumore. È stato anche possibile individuare l'ipermetilazione di *BMP3*, *PHACTR3*, *SFRP2*, *SPG20*, *TFPI2* e *TMEFF2* in campioni fecali in associazione con gli stadi precoci del cancro coloretale (43-45). Infine, la metilazione del gene *PITX2* (paired-like homeodomain transcription factor 2) è un promettente marcatore di progressione per vari tipi di tumore ed è particolarmente interessante nel caso del carcinoma mammario (46). I marcatori analizzati sono stati misurati sia in campioni di sangue intero o leucociti, sia nel plasma o nel siero, benché questi ultimi saggi necessitino di ulteriori controlli e validazioni.

Anche nell'ambito delle patologie a carico del sistema nervoso, la perturbazione dei meccanismi epigenetici è emersa come caratteristica centrale; molte di queste alterazioni sono misurabili nei tessuti centrali e, occasionalmente, periferici. Mentre nel primo caso la possibilità di usare le modificazioni epigenetiche come biomarcatori è ovviamente molto limitata dal difficile accesso a biopsie di tessuto, nel caso le modificazioni siano presenti a livello sistemico potranno avere un significativo valore traslazionale come biomarcatori per lo screening, la diagnosi precoce e la prognosi. L'unica possibilità di misurare eventi epigenetici ristretti al sistema nervoso centrale, è dato dall'analisi delle cellule eventualmente presenti nel liquor; nonostante la scarsità di questo materiale, la sensibilità delle tecniche per lo studio della metilazione, che si spinge fino al livello di singola cellula, può comunque garantire l'esecuzione dell'analisi. Come per i tumori, questi marcatori sono molto promettenti anche per lo sviluppo di terapie personalizzate e per monitorare la progressione e le risposte al trattamento (47). Ad oggi, sono stati indicati un numero molto elevato di geni caratterizzati dalla presenza di profili di metilazione alterati a carico dei loro promotori. Un elenco di quelli che hanno fornito i risultati più consistenti include: *B3GALT4*, *ZADH2*, *RIN3*, *MEF2C*, *ANK1*, *BIN1*, *RHBDF2*, oltre al già citato *PSEN1* attualmente in studio dal nostro gruppo di ricerca (36, 48-50). La metilazione di questi loci correla molto bene con i risultati dei test neurologici e con i marcatori biochimici classici dell'AD, ovvero la presenza di amiloide 1-42 e tau iperfosforilata nel sangue e nel liquor. Come in altri casi, la validità di tali marcatori andrà verificata nel sangue dei pazienti in studi clinici sufficientemente ampi.

Benché le patologie tumorali e quelle neurodegenerative rappresentino al momento gli ambiti applicativi più promettenti per l'introduzione di marcatori epigenetici nella pratica clinica, l'interesse si è allargato anche alle altre patologie caratterizzate da una componente epigenetica, come ad esempio il diabete (51) e le patologie allergiche (52).

CONCLUSIONI

L'utilizzo della metilazione del DNA come marcatore biologico risulta molto attraente considerando l'attuale orizzonte della terapia clinica che si sta orientando sempre di più verso la medicina personalizzata. Infatti, il pattern di metilazione individuale di un dato gene target, può fornire indicazioni molto importanti per caratterizzare una patologia a livello individuale e per predire la risposta ai trattamenti farmacologici. Inoltre l'applicazione in campo diagnostico è favorita dalla stabilità dell'analita target, cioè il DNA, e dall'accuratezza, precisione, sensibilità e risoluzione molto elevate dei saggi, potenzialmente in grado di rivelare il pattern di metilazione a livello di singola citosina. Per contro, proprio la variabilità individuale, che caratterizza le modificazioni epigenetiche, potrebbe rappresentare una potenziale complicazione perché diminuisce la predittività clinica dei saggi. In molti casi, anche a causa di un insufficiente potere statistico degli studi effettuati, i geni esaminati non hanno mostrato il potenziale per essere utilizzati come marcatori diagnostici individuali, suggerendo l'opportunità di concepire dei pannelli costituiti da più geni. Sarà quindi necessario validare le analisi proposte su coorti di pazienti molto numerose per poter stabilire valori quantitativi e pattern di metilazione di riferimento adeguati.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging*. 2002;6:39-42.
2. Borro M, Cavallaro RA, Gentile G, et al. One-carbon metabolism alteration affects brain proteome profile in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;22:1257-68.
3. Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiol Aging*. 2011;32:1192-5.
4. Nicolai V, Lucarelli M, Fuso A. Environment, epigenetics and neurodegeneration: Focus on nutrition in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2015;68:8-12.
5. Fuso A. Aging and Disease: the epigenetic bridge. In: Tollefsbol TO, ed. *Epigenetic in human disease*; 2nd edition. London: Elsevier Science Publisher, 2018:935-974.
6. Saluz H, Jost JP. Major techniques to study DNA methylation. *EXS* 1993;64:11-26.
7. von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. *Swiss*

- Med Wkly 2013;143:w13799.
8. Singer-Sam J, Grant M, LeBon JM, et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol* 1990;10:4987-9.
 9. Fuso A, Scarpa S, Grandoni F, et al. A reassessment of semiquantitative analytical procedures for DNA methylation: comparison of bisulfite- and HpaII polymerase-chain-reaction-based methods. *Anal Biochem* 2006;350:24-31.
 10. Fuso A, Ferraguti G, Scarpa S, et al. Disclosing bias in bisulfite assay: MethPrimers underestimate high DNA methylation. *PLoS One* 2015;10(2):e0118318.
 11. Kawai J, Hirotsune S, Hirose K, et al. Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5604-8.
 12. Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999;59:2307-12.
 13. Sadikovic B, Haines TR, Butcher DT, et al. Chemically induced DNA hypomethylation in breast carcinoma cells detected by the amplification of intermethylated sites. *Breast Cancer Res* 2004;6:R329-37.
 14. Fazzari MJ, Grealley JM. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Methods Mol Biol* 2010;620:243-65.
 15. Fouse SD, Nagarajan RO, Costello JF. Genome-scale DNA methylation analysis. *Epigenomics* 2010;2:105-217.
 16. Shi H, Maier S, Nimrich I, et al. Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications. *J Cell Biochem* 2003;88:138-43.
 17. Rauch TA, Pfeifer GP. DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA). *Methods* 2010;52:213-7.
 18. Sørensen AL, Collas P. Immunoprecipitation of methylated DNA. *Methods Mol Biol* 2009;567:249-62.
 19. Pålmeke N, Santacruz D, Walter J. Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. *Methods* 2011;53:175-84.
 20. Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M, et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:315-24.
 21. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000;183:145-54.
 22. Hendrich B. Methylation moves into medicine. *Curr Biol* 2000;10:R60-63.
 23. Kumar A. Rett and ICF syndromes: methylation moves into medicine. *J Biosci* 2000;25:213-4.
 24. Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, et al. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol* 1999;154:635-47.
 25. Lill CM, Bertram L. Towards unveiling the genetics of neurodegenerative diseases. *Semin Neurol* 2011;31:531-41.
 26. Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, et al. Emerging neurotoxic mechanisms in environmental factors-induced neurodegeneration. *Neurotoxicology* 2012;33:833-7.
 27. Migliore L, Coppedè F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 2009;667:82-97.
 28. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med* 2011;12:535-45.
 29. Zaina S, Lund G. Epigenetics: a tool to understand diet-related cardiovascular risk? *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4:261-74.
 30. Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet* 2011;43:595-600.
 31. Chestnut BA, Chang Q, Price A, et al. Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *J Neurosci* 2011;31:16619-36.
 32. Evans-Galea MV, Carroddus N, Rowley SM, et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* 2012;71:487-97.
 33. Laffita-Mesa JM, Bauer PO, Kourí V, et al. Epigenetics DNA methylation in the core ataxin-2 gene promoter: novel physiological and pathological implications. *Hum Genet* 2012;131:625-38.
 34. International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS Genet* 2011;7:e1002142.
 35. Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 2008;3:e2698.
 36. Bakulski KM, Dolinoy DC, Sartor MA, et al. Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis* 2012;29:571-88.
 37. Fuso A, Nicolia V, Ricceri L, et al. S-adenosylmethionine reduces the progress of the Alzheimer-like features induced by B-vitamin deficiency in mice. *Neurobiol Aging* 2012;33:1482.e1-16.
 38. Cottrell SE. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem* 2004;37:595-604.
 39. Khandige S, Shanbhogue VV, Chakrabarty S, et al. Methylation markers: a potential force driving cancer diagnostics forward. *Oncol Res* 2011;19:105-10.
 40. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:219-40.
 41. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 2011;21:74-87.
 42. Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1707-21.
 43. Noehammer C, Pulverer W, Hassler MR, et al. Strategies for validation and testing of DNA methylation biomarkers. *Epigenomics* 2014;6:603-22.
 44. Henriksen SD, Madsen PH, Krarup H, et al. DNA Hypermethylation as a Blood-Based Marker for Pancreatic Cancer: A Literature Review. *Pancreas* 2015;44:1036-45.
 45. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, et al. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: a systematic review. *Colorectal Dis* 2016;18:549-61.
 46. Aubele M, Schmitt M, Napieralski R, et al. The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Dis Markers* 2017;2017:4934608.
 47. Qureshi IA, Mehler MF. Developing epigenetic diagnostics and therapeutics for brain disorders. *Trends Mol Med* 2013;19:732-41.
 48. Madrid A, Hogan KJ, Papale LA, et al. DNA Hypomethylation in Blood Links B3GALT4 and ZADH2 to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018;66:927-34.
 49. Boden KA, Barber IS, Clement N, et al. Methylation Profiling RIN3 and MEF2C Identifies Epigenetic Marks

- Associated with Sporadic Early Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Rep* 2017;1:97-108.
50. De Jager PL, Srivastava G, Lunnon K, et al. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci* 2014;17:1156-63.
 51. Montagnana M, Lippi G, Danese E. Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1. *Biochim Clin* 2018;42:97-103
 52. De Palma FDE, Paparo L, Nocerino R. Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino. *Biochim Clin* 2018;42:103-11.

Gammopatie monoclonali di significato clinico

Fausto Adami

Studioso Senior, Università di Padova

ABSTRACT

Monoclonal gammopathies of clinical significance.

This Opinion is aimed to comment and emphasize the main points raised in a seminal paper published in 2018 in Blood. The paper deals with a number of severe diseases caused by small lymphoid/plasma cell clones. These clones affect different organs by means of the biological properties of the clonal cells themselves and/or of their secretion products such as monoclonal immunoglobulins, cytokines and other molecules. More importantly, the paper also deals with the pathogenetic mechanisms involved in the organ damage and sheds light on most of them. The present comment aims to bring attention to these diseases, but it does not encompass the whole matter. We suggest that the readers involved in this matter refer to the paper in its original version.

Lo scorso anno è stato pubblicato un importante lavoro nel quale sono state descritte numerose entità cliniche causate da cloni secernenti B-linfocitari o plasmacellulari, sia pure di limitata estensione e ne sono stati elucidati o ipotizzati anche i relativi meccanismi patogenetici (1). Questo commento si propone di portare all'attenzione del lettore questi argomenti che, introdotti per la prima volta nel 2006, sono stati qui aggiornati ed ampliati ma non è esaustivo di tutta la materia. I lettori interessati all'approfondimento sono invitati alla lettura dell'articolo originale.

Chi nei decenni passati si è occupato di malattie plasmacellulari e linfoproliferative B-secernenti ha presto familiarizzato con il termine MGUS ovvero *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* introdotto da R. Kyle nel 1978 (2). La denominazione intendeva identificare quei casi in cui la componente monoclonale (CM) sierica non costituiva una manifestazione di una malattia linfo/plasmaproliferativa clinicamente manifesta [mieloma multiplo (MM), macroglobulinemia di Waldenström (MW), amiloidosi AL ed altre], ma conferiva un documentato rischio evolutivo in tale direzione. Il termine meramente descrittivo di *undetermined* fu coniato stante l'impossibilità di identificare quei pazienti nei quali si sarebbe poi effettivamente verificata tale evoluzione. Negli anni a seguire i numerosi contributi tesi ad identificare i fattori di rischio evolutivo si sono concentrati pressoché esclusivamente sulla proliferazione/amplificazione del clone secernente, così come numerose sono state le segnalazioni di patologie

associate a CM per lo più sieriche. Con il tempo, l'estensione del clone neoplastico alla diagnosi è emersa come il fattore di rischio maggiormente significativo, almeno per quanto riguarda l'evoluzione a MM e MW, malattie caratterizzate, in fase florida, da una generalmente ampia infiltrazione neoplastica midollare e/o linfonodale. Nel 2006 Merlini et al. (3) hanno evidenziato che altre gravi malattie possono essere sostenute da cloni di limitata estensione e a bassa cinetica proliferativa. In queste circostanze il danno d'organo viene a verificarsi non tanto per la proliferazione delle cellule del clone ma a causa di altre proprietà biologiche del clone e/o della CM secreta, la quale è da considerare quindi non solo un marcatore di malattia ma causa essa stessa di malattia (4,5). Le entità patologiche identificate erano malattie da accumulo, malattie causate dall'attività anticorpale della CM ed altre a patogenesi non del tutto chiara. Come primo corollario veniva sottolineata la necessità, per l'ematologo, di valutare accuratamente un possibile legame patogenetico fra piccole CM e danni d'organo extraematologici (rene, cuore, nervi periferici ed altro). Una seconda conseguenza è consistita (e tuttora consiste) nel ridimensionamento numerico delle malattie che erano state associate a CM sulla base di soli dati epidemiologici/statistici. Tali associazioni, segnalate in precedenza - a titolo esemplificativo e non esaustivo riportate nelle referenze (6-19), erano state riproposte anche nel 2009 (20).

Nella pubblicazione oggetto di questo commento (1),

Corrispondenza a: Fausto Adami, Studioso Senior Università di Padova, Tel +39 041715277, E-mail f.adami@unipd.it

Ricevuto: 21.10.2019

Revisionato: 22.10.2019

Accettato: 02.11.2019

Publicato on-line: 15.11.19

DOI: 10.19186/BC_2019.72

viene ampliato il pannello delle malattie per le quali il legame patogenetico con la CM (o con altre molecole secrete dal clone) è stato dimostrato o ipotizzato e sono formulate nuove ipotesi patogenetiche sulla base di più recenti acquisizioni. Per queste situazioni è stato proposto il termine di *Monoclonal Gammopathy of Clinical Significance* (MGCS) (1) riprendendo il termine *Monoclonal Gammopathy of Renal Significance* (MGRS) coniato qualche anno fa (21), limitato a malattie renali correlate a CM e recentemente aggiornato (22). Viene nuovamente sottolineata l'importanza clinica (cioè le implicazioni terapeutiche) del riconoscimento del legame patogenetico fra CM e malattie precedentemente considerate svincolate da essa poiché il riconoscimento precoce e una terapia appropriata, mirata al ridimensionamento del clone, possono prevenire il danno d'organo o arrestarne la progressione.

Posto che non è l'espansione neoplastica del clone ma le proprietà biologiche delle sue cellule e/o le proprietà biologiche e/o chimico-fisiche delle molecole secrete a causare queste malattie, sono stati enucleati i principali meccanismi con i quali si realizzano questi quadri clinici. Essi sono:

- MGCS da deposito della CM;
- MGCS da attività autoanticorpale delle CM;
- MGCS da attivazione della via alternativa del complemento;
- MGCS da secrezione di citochine;
- MGCS da meccanismi non ancora identificati.

Nel primo gruppo (malattie da deposito della CM) sono rappresentate le malattie da deposito organizzato (amiloidosi AL, crioglobulinemia di tipo I, sindrome di Fanconi acquisita ed altre) e non organizzato [malattie da deposito di immunoglobuline monoclonali-(MIDD), glomerulonefrite proliferativa con depositi di immunoglobuline monoclonali]. Ad eccezione della cornea e della cute (coinvolte nella cheratopatia da cristalli e nella macroglobulinosi rispettivamente) questo gruppo di MGCS comprende quadri di natura sistemica che hanno però in comune l'interessamento renale. Nella maggior parte di esse, la diagnosi richiede obbligatoriamente studi di immunoistochimica, immunofluorescenza e microscopia elettronica su biopsia renale. Il laboratorio può contribuire alla diagnosi con il rilievo del tipo e entità della CM e di sue eventuali proprietà fisico-chimiche (crioprecipitazione), con la misura della frazione C4 del complemento, con la caratterizzazione dei parametri della funzionalità renale (creatinina, eGFR, entità e caratterizzazione delle proteine urinarie) e con la valutazione dei biomarcatori di danno d'organo per i quadri ad interessamento extrarenale. Questi stessi parametri saranno poi indispensabili nel monitoraggio della malattia.

Nel gruppo caratterizzato dalla attività autoanticorpale della CM, si trovano quadri generati da attività anticorpale della CM, alcuni dei quali molto rari. Fra i più comuni sono da menzionare: la crioglobulinemia mista tipo II correlata nel 90% dei casi ad infezione da HCV, consistente in una vasculite da immunocomplessi (costituiti da IgM monoclonale anti

IgG policlonali) con manifestazioni potenzialmente sistemiche ma prevalenti a livello cutaneo, renale e del nervo periferico; le neuropatie periferiche da IgM monoclonali con specificità anti MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) e la malattia da agglutinine a frigore caratterizzata da ischemia delle estremità ed anemia emolitica indotte da IgM monoclonali ad attività anti-I. In questo gruppo di pazienti i dati di laboratorio e l'osservazione clinica possono fornire una solida base per la diagnosi: basti pensare al rilievo del fattore reumatoide ed alla determinazione della frazione C4 del complemento nella diagnosi e nel monitoraggio della crioglobulinemia di tipo II e alla misura della concentrazione delle IgM anti-MAG. Più complessa la diagnostica di laboratorio mirata ad identificare immunoglobuline (Ig) monoclonali ad attività anti-inibitore del fattore C1 del complemento e ad Ig monoclonali o immunocomplessi a variabile azione anti-fattore di von Willebrand, responsabili rispettivamente dell'edema angioneurotico acquisito e di più rare sindromi emorragiche.

Il terzo gruppo (MGCS da attivazione della via alternativa del complemento) è rappresentato dalla glomerulopatia C3, caratterizzata dal deposito glomerulare di C3 in assenza di deposito di Ig e da una sindrome uremico-emolitica atipica. In entrambe queste situazioni il ruolo della Ig monoclonale è desunto dalla attività anti-proteine della via alternativa del complemento (con meccanismo peraltro non chiaro) e dai benefici effetti della terapia mirata al clone. In entrambi i casi il laboratorio può contribuire in maniera significativa alla diagnosi evidenziando ridotti livelli di C3 (23).

Il quarto gruppo si caratterizza per le capacità del clone di secernere citochine. La sindrome POEMS è paradigmatica di questo gruppo. Benché la patogenesi sia non del tutto chiara, questa enigmatica e pleomorfa sindrome sembra in larga parte attribuibile ad una iperincrescenza di *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) con il probabile concorso di altre citochine (IL-12, IL-6, *Tumor Necrosis Factor-α* ed altre) da parte di un clone di esigue dimensioni. Il sospetto clinico è avanzato in prima istanza in ambito neurologico a causa della neuropatia periferica, che è caratteristica comune, precoce ed obbligatoria per la diagnosi. Il laboratorio può contribuire con la identificazione della CM, spesso così esigua da essere evidente solo con una sensibile immunofissazione del siero; elevate concentrazioni del VEGF sierico possono confermare il sospetto, anche se sono descritti rari casi di mancato aumento dello stesso. La diagnosi è comunque clinica e si basa sul soddisfacimento di criteri stabiliti (24), due dei quali (la CM e la neuropatia periferica) sono obbligatori. La sindrome è stata esaminata più in dettaglio nella rassegna pubblicata su questo numero del giornale (25)

L'ultimo gruppo è piuttosto eterogeneo e comprende entità la cui patogenesi è talvolta poco chiara. Sono comprese in questo gruppo: malattie emorragiche da interazione delle cellule del clone o della Ig monoclonale con fattori della coagulazione o con la funzione

piastrinica; malattie cutanee come il pioderma gangrenoso, la sindrome di Sweet, lo scleromixedema e la cutis laxa acquisita; la sindrome di Schnitzler caratterizzata da orticaria, neutrofilia, febbre, artro-mialgie in presenza di IgM monoclonali. In quest'ultima malattia, l'efficacia di anakinra, un farmaco con attività contro il recettore di IL-1 depone per un ruolo patogenetico di questa citochina nel contesto di processi autoinfiammatori disregolati acquisiti, analogamente a quanto accade nella controparte congenita (26).

In conclusione: la rassegna in questione (1) amplia il panorama delle malattie correlate a piccoli cloni B-linfocitari/plasmacellulari e illumina ulteriormente i meccanismi patogenetici che legano le une agli altri. Il riscontro e/o il sospetto di una di queste malattie dovrà impegnare tutti i clinici a ricercare specificamente CM sieriche e l'ematologo a valutare possibili relazioni con un clone secernente per quanto esiguo. Il ruolo patogenetico del clone ha conseguenze pratiche rilevanti, poiché una terapia mirata al suo contenimento si rivela spesso efficace nel ridurre gli effetti deleteri della sua attività. Il legame può essere sfuggente ed il sospetto va consolidato da indagini talvolta sofisticate o comunque impegnative. A questo impegno è chiamato anche il laboratorio di biochimica clinica che, nelle situazioni qui descritte come del resto nella gestione di tutte le discrasie plasmacellulari, deve essere consapevole della potenziale rilevanza di un dato anche non eclatante e deve mettere in campo le metodologie più sensibili per definirlo, specie per quanto riguarda la diagnostica proteica (ricerca, tipizzazione, quantificazione delle CM sieriche e urinarie). Anche in queste malattie il contributo del laboratorio potrà così confermarsi fondamentale in fase diagnostica e indispensabile nel monitoraggio.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Femand JP, Bridoux F, Dispenzieri A, et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications. *Blood* 2018;132:1478-85.
2. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: Natural history in 241 cases. *The American Journal of Medicine* 1978;64:814-26.
3. Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood* 2006;108:2520-30.
4. Merlini G. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012;36:25-8.
5. Milani P, Palladini G, Graziani M, et al. Componenti monoclonali piccole ma dannose. *Bichim Clin* 2013;37:431-34.
6. Maldonado JE, Riggs BL, Bayrd ED. Pseudomyeloma. Is association of severe osteoporosis with serum monoclonal gammopathy an entity or a coincidence? *Arch Intern Med* 1975;135:267-70.
7. Gelfand JA, Boss GR, Conley CL, et al. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency and angioedema: a review. *Medicine (Baltimore)* 1979;58:321-8.
8. Chen HP, Carroll JA. Monoclonal gammopathy in carcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol* 1980;73:607-10.
9. Ghirlanda G, Perri F, Manna R, et al. Association of ankylosing spondylitis and monoclonal gammopathy: clinical case report and pathogenetic considerations. *Z Rheumatol* 1984;43:42-5.
10. Kiproff DD, Miller RG. Polymyositis associated with monoclonal gammopathy. *Lancet* 1984;2:1183-6.
11. Hendrick AM, Mitchison HC, Bird AG, et al. Paraproteins in primary biliary cirrhosis. *Q J Med* 1986;60:681-4.
12. Matsubayashi S, Tamai H, Nagai K, et al. Monoclonal gammopathy in Hashimoto's thyroiditis and malignant lymphoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1136-9.
13. Bellotti V, Gamba G, Merlini G, et al. Study of three patients with monoclonal gammopathies and 'lupus-like' anticoagulants. *Br J Haematol* 1989;73:221-7.
14. Simmons Z, Albers JW, Bromberg MB, et al. Long-term follow-up of patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, without and with monoclonal gammopathy. *Brain* 1995;118 (Pt 2):359-68.
15. Pham H, Lemoine A, Salvucci M, et al. Occurrence of gammopathies and lymphoproliferative disorders in liver transplant recipients randomized to tacrolimus (FK506)- or cyclosporine-based immunosuppression. *Liver Transpl Surg* 1998;4:146-51.
16. Arnulf B, Bengoufa D, Sarfati E, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy in patients with primary hyperparathyroidism: a prospective study. *Arch Intern Med* 2002;162:464-7.
17. Srkalovic G, Cameron MG, Rybicki L, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma are associated with an increased incidence of venothromboembolic disease. *Cancer* 2004;101:558-66.
18. Gregersen H, Jensen P, Gislum M, et al. Fracture risk in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2006;135:62-7.
19. Silverman BA, Ku M, Kapur P, et al. Monoclonal gammopathy in association with allergic disorders of the skin and respiratory tract. *Allergy Asthma Proc* 2006;27:130-9.
20. Bida JP, Kyle RA, Therneau TM, et al. Disease associations with monoclonal gammopathy of undetermined significance: a population-based study of 17,398 patients. *Mayo Clin Proc* 2009;84:685-93.
21. Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, et al. Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood* 2012;120:4292-5.
22. Leung N, Bridoux F, Batuman V, et al. Publisher Correction: The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. *Nat Rev Nephrol* 2019;15:121.
23. Chauvet S, Fremeaux-Bacchi V, Petitprez F, et al. Treatment of B-cell disorder improves renal outcome of patients with monoclonal gammopathy-associated C3 glomerulopathy. *Blood* 2017;129:1437-47.
24. Dispenzieri A. POEMS Syndrome: 2019 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2019;94:812-27.
25. Adami F, Berno T, Riva M, et al. Gammopatie monoclonali: quadri clinici principali e ruolo del laboratorio. *Biochim Clin* 2019;43:366-83.
26. Rowczenio DM, Pathak S, Arostegui JI, et al. Molecular genetic investigation, clinical features, and response to treatment in 21 patients with Schnitzler syndrome. *Blood* 2018;131:974-81.

La Medicina di Laboratorio: gli specialisti di domani

Giulia Sancesario^{1,2}, Marco Alfonso Perrone^{1,3}, Cristina Pellegrini⁴, Cristiano Ialongo⁵, Ada Aita⁶, Pradeep Kumar Dabla^{7,8}, Santiago Fares Taie^{8,9}, Julien Favresse¹⁰, Anna Velts-Lindh¹¹, Valeria D'Argenio^{12,13}, Massimiliano Ammirabile¹⁴, Federica Spolaore⁶, Carlo Renzi¹, Mario Nuvolone^{15,16}, Federica Cariati^{13,17}, Claudia Bellini¹⁸, Marco Benati¹⁹, Gian Luca Salvagno¹⁹, Mario Plebani⁶, Sergio Bernardini¹

¹Dipartimento di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma

²Dipartimento di Neurologia Clinica e Comportamentale, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

³Dipartimento di Cardiologia, Università Tor Vergata, Roma

⁴Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche, Università de L'Aquila

⁵Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università La Sapienza, Roma

⁶Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Università di Padova

⁷Dipartimento Biochimica, Istituto G.B.Pant di Medicina, Maulana Azad Medical College, GNCTD, Delhi, India

⁸IFCC-Task Force "Young Scientists"

⁹Fares Taie Istituto di Analisi Fares Taie, Laboratorio di Biochimica, Mar del Plata, Argentina

¹⁰Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Clinica Universitaria St-Luc e Università Cattolica di Louvain, Brussels, Belgio

¹¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Centrale West Tallinn, Tallin, Estonia

¹²CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli

¹³Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II

¹⁴Laboratorio di Biochimica Clinica e Microbiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

¹⁵Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

¹⁶Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

¹⁷Kronos DNA srl

¹⁸Unità Operativa Complessa di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

¹⁹Sezione Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona

ABSTRACT

Laboratory Medicine: specialists of tomorrow. Laboratory Medicine rides the wave of technological progress, the metamorphosis of information systems and data management. The Young Specialist is not a mere observer, but rather takes a leading role in this change, taking advantage of the opportunities offered by "omics" technologies, capturing new ideas and innovative stimuli that lead to a new concept of work and research oriented to health and prevention. Thanks to the support of international web platforms, training and exchange programs supported by the International Scientific Societies and Federations that favor professional and scientific growth, Young Scientists work in a global context. In this scenario, the SIBioC Young Scientists Study Group, with the auspices of SIBioC, EFLM and IFCC, organized a meeting on "Laboratory Medicine: Specialists of tomorrow" with the aim of discussing and highlighting some of the most important challenges, such as technological progress, training and internationalization of young people. Finally, the future of laboratory medicine looks at a multidisciplinary approach that leads to integrated diagnosis, identification of the frail patient, the use of the Point of Care Testing as an indispensable tool in crisis areas, making the dialogue between physician and laboratory specialist a fundamental step for the diagnosis and treatment with the final aim of a better outcome for the patient.

Corrispondenza a: Giulia Maria Sancesario, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Policlinico Universitario Tor Vergata, Via Oxford 81, 00133 Roma, Italia, Tel 06 20902340, E-mail giulia.sancesario@gmail.com

Ricevuto: 01.02.2019

Revisionato: 28.03.2019

Accettato: 15.04.2019

Publicato on-line: 04.07.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.039

INTRODUZIONE

La Medicina di Laboratorio rappresenta un valore essenziale per la salute della collettività e per il Servizio Sanitario Nazionale, ed oggi, pur essendo impropriamente considerata una “Cenerentola” tra le differenti e numerose specialità mediche, si trova ad affrontare importanti sfide in ambito di innovazione tecnologica.

Molte evidenze dimostrano come esista un legame significativo tra innovazione in Medicina di Laboratorio e qualità dei servizi erogati, idoneità dei percorsi di cura e possibilità di implementare strategie di prevenzione (1). Il giovane professionista e ricercatore in Medicina di Laboratorio, o *Young Scientist*, ha un ruolo chiave in questo contesto, e cerca di cogliere le nuove opportunità date dalle evoluzioni tecnologiche, tra le quali va menzionata ad esempio la creazione di un laboratorio “intelligente” che sfrutti l’intelligenza artificiale (IA) non solo per automatizzare i processi, ma anche per integrare le informazioni e gestire i flussi, oppure dall’utilizzo delle scienze “omiche” che rappresentano una sfida nel passaggio dalla ricerca alla medicina di precisione. Nasce quindi una nuova dimensione del “Laboratorio del domani”, in cui diventa fondamentale l’approccio multidisciplinare ed integrato, ed in cui il professionista di laboratorio svolge un ruolo attivo nel dialogo con il clinico, la cosiddetta *stewardship* del laboratorio clinico (2).

In questo lavoro sono raccolti alcuni importanti temi discussi nel corso del convegno “Laboratory Medicine: Specialists of tomorrow” organizzato dal Gruppo di Studio SIBioC *Young Scientists* con il patrocinio di SIBioC, EFLM e IFCC. In particolare, sono riportati gli aspetti del rinnovamento culturale di cui lo specialista del domani è testimone, e cioè l’approccio multidisciplinare della Medicina di Laboratorio e del rapporto tra Medicina Clinica e Diagnostica di Laboratorio, l’informatizzazione e la sanità digitale, i *big data* e il contesto di internazionalizzazione della disciplina. Infine, sono riportate alcune esperienze concrete su quelle che saranno, plausibilmente, le sfide del laboratorio del domani, come la gestione del rischio nella fase preanalitica, l’identificazione del paziente fragile, l’utilizzo dei *Point of Care Testing* (POCT) come strumento indispensabile nelle aree di crisi, e il laboratorio avanzato per lo studio delle malattie cardiovascolari.

Medicina di laboratorio: la Cenerentola del servizio sanitario?

Per lungo tempo la Medicina di Laboratorio ha assunto il ruolo di “Cenerentola” rispetto alle altre specialità in campo medico. Negli ultimi dieci anni, tuttavia, il laboratorio clinico è diventato il centro nevralgico della medicina diagnostica, fornendo informazioni essenziali non solo per la diagnosi ed il monitoraggio, ma anche per lo screening, la prevenzione, la diagnosi precoce e le terapie

personalizzate. Il 60-70% delle decisioni cliniche (ricoveri, dimissioni, terapie) è influenzato dagli esami di laboratorio e l’*Institute of Medicine* (IOM) ha riconosciuto questo ruolo nevralgico includendo il servizio di Medicina di Laboratorio tra le 10 categorie di servizi essenziali nel sistema sanitario degli Stati Uniti (3). Tuttavia, fattori interni ed esterni, quali l’introduzione di esami sempre più complessi nei campi diagnostici emergenti (si pensi alle tecnologie di biologia molecolare applicate alla diagnostica oncologica), l’avvento delle scienze “omiche”, oppure le politiche di consolidamento, efficientamento e riconfigurazione, sono alla base della profonda trasformazione della Medicina di Laboratorio. Il professionista di laboratorio è, dunque, chiamato ad affrontare nuove sfide, ad integrare le conoscenze e le competenze tecniche acquisite negli anni di formazione universitaria con competenze amministrative non ancora incluse nei piani di formazione ministeriale, promuovendo una visione più ampia delle esigenze dell’assistenza sanitaria, ma soprattutto del paziente. Al fine di incoraggiare una nuova visione del futuro della Medicina di Laboratorio, Plebani et al. hanno pubblicato di recente il “Manifesto sul futuro dei professionisti della Medicina di Laboratorio” che individua i dieci compiti essenziali del professionista di laboratorio oggi e nel prossimo futuro (2). In particolare, il giovane professionista di laboratorio deve essere in grado di:

- convertire i risultati in informazioni cliniche;
- collaborare con i colleghi promuovendo la riduzione dell’errore diagnostico e del rischio per il paziente;
- favorire un’affidabile *stewardship* della Medicina di Laboratorio;
- combinare i dati di tutte le specialità di laboratorio e della diagnostica per immagini in un unico report;
- definire intervalli di riferimento e limiti decisionali appropriati;
- favorire un efficace lavoro di squadra costruendo gruppi multidisciplinari;
- promuovere il modello di laboratorio basato sul valore clinico piuttosto che sul volume di lavoro;
- migliorare e aggiornare la visione della Medicina di Laboratorio nell’immaginario collettivo ed in relazioni alle altre specialità mediche;
- non trascurare le competenze e i doveri gestionali;
- promuovere il valore della professione.

Secondo il Manifesto di Plebani et al., il giovane professionista di laboratorio viene, dunque, presentato, non più come un semplice produttore di dati, ma come responsabile dell’informazione, come costruttore di processi e sistemi, custode della qualità, imprenditore e dirigente, team leader e contemporaneamente membro di quello stesso gruppo, educatore e consulente, nonché sostenitore dei pazienti. Una nuova visione volta comunque a garantire un unico obiettivo: l’esame giusto, al momento giusto, al paziente giusto (2).

IL FUTURO DELLA SANITÀ DIGITALE E DEI SISTEMI INFORMATIVI

L'evoluzione dell'informatica di laboratorio e delle scienze biomediche in generale è un fenomeno scientifico-tecnologico iniziato negli anni '60 del XX secolo, quando alcuni ricercatori del *Massachusetts General Hospital* di Boston furono abili nell'intuire la rivoluzione che il *personal computing* digitale avrebbe comportato nel mondo della sanità (4). Non a caso, negli stessi anni, la *National Library of Medicine* (NLM) decise di riversare il proprio *Index Medicus* (compilato sin dal 1879) nel primo database elettronico che, oggi, è noto come MEDLINE (4). Sessant'anni dopo, la sintesi di questo processo è nel concetto di *Digital Health* (DH) o Sanità Digitale, una realtà non solo scientifica ma, anche, economica che muove un mercato da 21 miliardi di euro e che vanta un portfolio vastissimo di prodotti dedicati tra i quali biosensori, applicativi (APP) per smartphone, programmi per la famiglia e software professionali per il *Data Mining* (5). La chiave della DH è l'identificazione dell'individuo in una forma "quantificabile" (*Quantified Self*) generata dall'insieme delle sue varie rilevazioni strumentali, digitalizzabile e trasmissibile, in grado di abbattere le distanze fisiche e temporali così da portare la medicina informatizzata direttamente a contatto con l'individuo (6). Frutto di questa massiva interrogazione sono i *Big Data*, un universo di informazioni nelle quali è possibile scavare (*mining*) per trovare tratti biofisici latenti, con cui spingere la medicina diagnostica e preventiva ad un livello tale da far stimare una potenziale riduzione della spesa sanitaria di oltre 7 miliardi di dollari nei soli Stati Uniti (5). Pertanto, se le prospettive sono di una sempre maggiore pervasività nella gestione della salute e dello stile di vita, così come oggi lo sono gli MP3 nella diffusione e ascolto della musica, DH e *Big Data* sono un'opportunità senza precedenti per la Medicina di Laboratorio e per i suoi professionisti, specialmente quelli di domani. E proprio a questi ultimi va ricordato che il loro ruolo sarà anche rivendicare la posizione di centralità ed avanguardia che la Medicina di Laboratorio ha nelle scienze biomediche, ricordando che gli specialisti della Medicina di Laboratorio hanno imparato a vedere l'individuo attraverso le sue misurazioni ben prima che la digitalizzazione costringesse tutti gli altri a fare i conti con il *Quantified Self*.

IL SISTEMA INFORMATICO DI LABORATORIO "INTELLIGENTE"

Automazione e informatizzazione costituiscono un *continuum* nella gestione dei processi del laboratorio clinico. Il loro connubio ha portato al raggiungimento di una serie di risultati notevoli negli ultimi 30 anni, non ultimo la riduzione degli errori intra- ed extra-analitici, del *Turn-Around Time* (TAT) e delle richieste urgenti (4). Questa evoluzione, che sembra essere giunta, oggi, al proprio apice, prefigura solo una futura crescita

ipertrofica del paradigma automazione, attraverso la ricerca di velocità e parallelismi esecutivi sempre più spinti, data dall'implementazione di macchine sempre più veloci e in numero maggiore sulla medesima linea operativa.

Tuttavia, un punto di svolta può essere possibile con un sistema automatizzato di laboratorio capace di sfruttare al meglio le risorse informatiche, quindi esaltando la precisione di gestione dei processi e la flessibilità di adattamento alle richieste operative. Un tale laboratorio "intelligente", capace di leggere le situazioni e modulare di conseguenza i flussi del *Total Testing Process* (TTP), può essere oggi realizzato grazie agli avanzamenti tecnologici che hanno reso economicamente e tecnicamente accessibile l'uso dell'IA.

Un esempio di questa visione è rappresentato dal Policlinico di Tor Vergata, dove l'automazione totale di laboratorio (TLA) è stata adottata dal maggio 2011, e dove un particolare risalto è stato dato alla possibilità di incrementare ulteriormente le prestazioni dei processi extra-analitici sfruttando l'intima connessione tra automazione ed informatizzazione (3-6). In particolare, un valido supporto può essere fornito dall'uso della rete neurale artificiale (ANN) per rendere il sistema informatico di laboratorio (LIS) capace di sfruttare le informazioni cliniche e para-cliniche (ad esempio il tempo trascorso dall'esame precedente) al fine di ottimizzare la gestione dei campioni da parte della TLA. A tal proposito, un insieme di 30 923 richieste (maggio 2014 - maggio 2015) per Troponina I cardio-specifica (cTNI) è stato opportunamente partizionato al fine di fornire un modello istruttivo e quindi un insieme di dati su cui testare la capacità dell'ANN di predire la necessità di diluire i campioni prima della loro analisi (Figura 1). Dai risultati ottenuti si è visto come questo modello di gestione intelligente permetta di ridurre il TAT di cTNI di quasi 25 minuti sulla mediana dei tempi di risposta (5). Inoltre, applicando il medesimo modello alla gestione dell'analisi delle catene leggere libere nel plasma, si è potuto osservare un potenziale risparmio del 70% dei materiali usati rispetto all'ordinario schema di diluizione (6). Pertanto, l'adozione di un LIS intelligente, capace di conferire flessibilità ed adattabilità alla TLA, fornisce un vantaggio operativo ed economico raggiungibile, che non richiede spese di aggiornamento tecnologico o logistiche, e che può essere implementata a costo zero, grazie alla possibilità di emulare l'ANN, mediante un software dedicato residente un PC da banco che dialoghi con il LIS e il middleware della TLA. Tuttavia, al fine di ottenere la massima produttività, qualora le risorse lo permettessero e lo sviluppo di tale approccio venisse promosso, sarebbe opportuno che l'ANN fosse nativamente parte del middleware TLA così da realizzare una automazione intelligente nel senso più completo del termine.

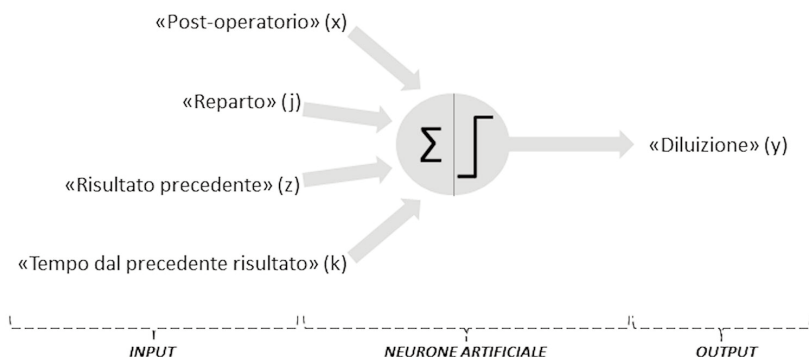


Figura 1

Schematizzazione di una rete neurale artificiale (ANN) costruita per la gestione "intelligente" del campione nel laboratorio clinico. In una rete neurale l'informazione rappresentata da diversi INPUT (x, j, z, k) viene integrata (Σ) nei neuroni artificiali per generare il segnale di uscita (\int) di attivazione (=1) o non-attivazione (=0) del output (y). In questo caso una serie di informazioni cliniche e laboratoristiche (ad esempio stato post operatorio del paziente, reparto di degenza, risultato precedente e tempo dal precedente risultato) sono usate per predire la necessità di pre-diluire i campioni per l'analisi della troponina I cardio-specifica (cTnI).

SCIENZE OMICHE E BIG DATA: APPLICAZIONI IN DIAGNOSTICA INTEGRATA

Lo sviluppo delle scienze omiche è uno dei principali traguardi scientifici dell'ultimo decennio, ed ha trasformato il modello di ricerca portando alla generazione di piattaforme che, misurando da poche centinaia a migliaia di analiti, hanno permesso di valutare e quantificare l'intero stato biochimico di un individuo, sia in un dato momento che longitudinalmente nel tempo, promuovendo il concetto di medicina di precisione, soprattutto per le malattie complesse (7).

Le applicazioni delle piattaforme omiche vanno dall'identificazione di geni (genomica), all'RNA messaggero (mRNA) (trascrittomica), ai fattori epigenetici (epigenomica), alle proteine (proteomica), ai metaboliti (metabolomica) e ai lipidi (lipidomica). Inoltre, anche lo studio del microbiota (il microbioma/metagenomica), o la ricerca in fluidi corporei non invasivi (biopsia liquida), hanno suscitato un notevole interesse specie nel contesto dello studio di malattie croniche e complesse (8). La necessità di modelli che tengano conto delle variazioni inter- e intra-individuali nella popolazione, il progresso, l'espansione e la riduzione dei costi della tecnologia omica, la maggior accessibilità alle tecniche, ma non necessariamente alle competenze per la loro interpretazione, hanno spostato l'attenzione sulla bioinformatica, permettendo di realizzare il potenziale di questi dati. D'altro canto però, si sono resi necessari un cambio di mentalità ed un approccio multidisciplinare. Nell'era dei *Big Data*, anche il laboratorio si trova di fronte ad una nuova sfida nella capacità di analizzarli ed interpretarli. Un esempio recente sono i *Cell Population Data* (CPD), parametri morfometrici (che definiscono cioè caratteristiche cellulari, quali fluorescenza, complessità, volume) che possono integrare i risultati della revisione microscopica (9). Sono parametri a costo zero (per un emocromo esistono fino ad 80 parametri), che richiedono una

interpretazione appropriata (Tabella 1). Ad esempio, presso l'Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio di Padova, sono stati analizzati i CPD, unitamente al conteggio differenziale leucocitario, in una popolazione di 331 pazienti stratificati per patologia (stato reattivo, infezione, sepsi, shock settico, patologie ematologiche in terapia con granulocline) mediante l'analizzatore Sysmex XN1000 (software 0015 Kobe, Giappone). La regressione logistica e l'analisi post-hoc hanno mostrato che, tra tutti i pazienti, in quelli con sepsi e shock settico vi erano differenze statisticamente significative per diversi parametri, sia tradizionali che di nuovo interesse (Tabella 1). Stratificando i pazienti per età, relativamente ai CPD, nei soggetti con più di 75 anni il parametro della complessità dei neutrofili (NE-SSC) permette di predire lo shock settico in modo statisticamente significativo ($P=0,0116$). Rispetto ai pazienti con infezioni, inoltre, quelli con sepsi hanno mostrato valori maggiori relativamente all'ampiezza della dimensione dei neutrofili (NE-WY) ($P<0,001$), l'ampiezza della complessità dei monociti (MO-WX) ($P=0,018$) e la fluorescenza dei linfociti (LY-Y) ($P=0,01$). Rispetto ai pazienti con sepsi, quelli con shock settico hanno mostrato anche valori maggiori della complessità dei monociti MO-WX ($P=0,013$). I parametri CPD forniscono informazioni sulle funzioni cellulari e, congiuntamente ai parametri ematologici, possono essere utili nella generazione di un miglior outcome clinico in pazienti con sepsi e shock settico, nella prospettiva della medicina di precisione.

Un notevole progresso è, inoltre, rappresentato dalla disponibilità di banche dati, contenenti le informazioni del genoma, del trascrittoma, del proteoma, dell'epigenoma, del metaboloma di individui e/o linee cellulari sane e patologiche. La funzione di tali database è di rendere disponibili, per la consultazione, migliaia di dati inerenti studi specifici su specifiche patologie. Numerosi insiemi di dati trascrittomici sono disponibili per una libera consultazione, rendendo possibile, ad

Tabella 1

Confronto tra i parametri leucocitari di "Cell Population Data" e parametri tradizionali ematologici che ha mostrato una differenza significativa.

PARAMETRO	ACRONIMO	Valore di significatività (p) (SEPSI vs SHOCK SETTICO)	Valore di significatività (p) (SEPSI vs INFEZIONE)	Valore di significatività (p) (PAZIENTI ≤ 75 anni vs >75 anni)
Parametri tradizionali				
Conteggio leucociti	WBC	P= 0,018	NS	NS
Conteggio Neutrofilii		P= 0,094	NS	NS
Concentrazione emoglobinica	HB	P= 0,001	NS	NS
Conteggio piastrine	PLT	P= 0,002	NS	NS
Frazione di piastrine immature	IPF	P<0,001	NS	NS
Granulociti Immaturi	IG	P= 0,019	NS	NS
Conteggio Monociti		P= 0,003	NS	NS
Monociti %		P= 0,019	NS	NS
Cell Population Data				
Complessità cellulare dei neutrofilii	NE-SSC	NS	NS	P= 0,012
Intensità di fluorescenza neutrofilica	NE-SFL	P= 0,041	NS	NS
Dimensione dei neutrofilii e grado di dispersione degli eventi misurati	NE- WY	NS	P= <0,001	NS
Complessità dei monociti e grado di dispersione degli eventi misurati	MO-WX	P=0,013	P= 0,018	NS

NS, non significativo.

Valori di $p < 0,05$ sono considerati statisticamente significativi.

esempio, la ricerca di geni particolarmente stabili in uno specifico scenario clinico o sperimentale, da utilizzare come geni di riferimento in protocolli di *Polymearse Chain Reaction* quantitativa (qPCR), dove la misurazione dei livelli trascrizionali di uno specifico trascritto di interesse dipende in modo critico dai geni di riferimento utilizzati ai fini della normalizzazione (10, 11). Infatti, la qPCR è ancora ampiamente utilizzata sia per la ricerca di base che per la diagnostica molecolare, grazie alla sua facilità d'uso, alla versatilità ed ai costi contenuti. La banca dati *Gene Expression Omnibus* (12) consente di indagare i livelli di espressione genica in insiemi di dati trascrittomici generati mediante microarray o sequenziamento dell'RNA precedentemente pubblicati. Sfruttando questa opportunità, è possibile effettuare uno screening in silico dei livelli di espressione di una serie di geni candidati per la normalizzazione, in modo da

individuare i geni maggiormente stabili e meritevoli di successiva verifica sperimentale. Una simile strategia è stata recentemente impiegata nel contesto di studi trascrizionali su plasmacellule di pazienti con amiloidosi AL, una rara discrasia plasmacellulare per la quale studi di espressione genica, potrebbero consentire l'identificazione di nuovi biomarcatori per la diagnosi, la stratificazione prognostica e la predizione alla risposta alla terapia diretta contro le plasmacellule tumorali (13).

Questa strategia è applicabile anche ad altre condizioni cliniche e sperimentali per le quali siano disponibili insiemi di dati trascrittomici accessibili per una libera consultazione.

Inoltre, le scienze omiche hanno un notevole impatto sulla caratterizzazione diagnostica e terapeutica in campo oncologico. Infatti, il cancro è una malattia molto eterogenea e un gruppo di cellule, all'interno del tumore

stesso, può talvolta mostrare profili genomici differenti. Di conseguenza, l'analisi di un insieme di cellule potrebbe non essere rappresentativa del comportamento delle singole cellule (14) con importanti ripercussioni sulle strategie diagnostico-terapeutiche. I recenti progressi tecnologici permettono di analizzare acidi nucleici e proteine di differenti aree tumorali o all'interno di uno stesso campione tumorale eterogeneo, grazie alla possibilità di isolare singole cellule (15, 16). Questo fornisce un approccio d'avanguardia nella prospettiva di una medicina di precisione.

L'IMPORTANZA DELLA COMUNICAZIONE TRA CLINICA E LABORATORIO

La creazione di nuovi algoritmi e nuovi software per la gestione del laboratorio analisi è una delle nuove frontiere della medicina, in quanto obiettivo della Medicina di Laboratorio dev'essere il fornire un risultato interpretativo, e non solo un mero risultato numerico, in virtù di una medicina di precisione, centrata sull'individuo. E', quindi, centrale il concetto di "stewardship di laboratorio clinico", ossia l'intervento del professionista di laboratorio nella consulenza richiesta dalla clinica e dal paziente (2).

Gli esami immunologici in automazione sono suscettibili a diversi tipi di interferenze che possono influenzare le decisioni cliniche. Nel caso degli esami utilizzati per valutare la funzione tiroidea, sono stati descritti sei principali tipi di interferenza noti per le misurazioni dell'ormone stimolante tiroideo (TSH), tiroxina libera e triiodotironina libera: la macro-TSH, la biotina¹, gli anticorpi anti-streptavidina, gli anticorpi anti-rutenio (anti-Ru), gli anticorpi anti-tiroide (THAAs) ed infine gli anticorpi eterofili (17).

La macro-TSH è un complesso circolante composto da TSH legato con l'anticorpo anti-TSH, che interferisce con la misura portando un falso incremento dei livelli di TSH. Nessuno dei saggi immunometrici a due siti usati per il TSH è in grado di discriminare la macro-TSH dal TSH libero, anche se alcune piattaforme sono più sensibili nell'identificarne la presenza. La biotina, che viene utilizzata in rari disordini metabolici come supplemento alla dieta, e la streptavidina possono formare complessi con l'anticorpo biotinilato o legato alla streptavidina impiegati nei saggi, portando a un falso aumento nella misurazione dell'analita. La presenza di anticorpi anti-Ru produce un'interferenza dovuta al legame con l'anticorpo rutenilato anti-T3, utilizzato nei saggi immunometrici, che comporta una interferenza nella misura di FT3, e può essere superato dall'uso di metodi che impiegano proteine che non legano il Rutenio. Infine, la presenza di auto-anticorpi anti-T4 e anti-T3 e di anticorpi eterofili polispecifici, che si formano nella risposta immunitaria prima della

maturazione di affinità, possono alterare la misurazione dei saggi immunometrici.

A causa della prevalenza di alcune di queste condizioni (che interessano almeno l'1% della popolazione generale) e dell'alta frequenza della richiesta di esami per la disfunzione tiroidea, l'errore dovuto all'interferenza potrebbe rappresentare una insidia reale (17). Nel 2017, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha richiamato l'attenzione sulla potenziale interferenza della biotina nella valutazione della funzionalità tiroidea, a causa di un numero crescente di eventi avversi (incluso un decesso). In un recente studio condotto presso la Mayo Clinic (Rochester, Minnesota), la biotina era presente in concentrazioni sieriche molto basse (≥ 10 ng/mL) nel 7,4% dei pazienti che si presentavano al pronto soccorso (1442 pazienti) tuttavia, tale concentrazione era sufficientemente elevata per poter influenzare i risultati dei saggi immunologici utilizzando la tecnologia biotina-streptavidina (18).

Le potenziali interferenze dovrebbero essere sospettate ogni volta che si presentano discrepanze cliniche o biochimiche e in questi casi deve essere intrapresa un'indagine approfondita sulle possibili cause (19). La loro identificazione, di solito, si basa su ulteriori esami di laboratorio, incluso il confronto con metodi diversi, su procedure di diluizione, su studi di blocco dei reagenti e la precipitazione con polietilenglicole. Sulla base del modello delle alterazioni degli esami di funzionalità tiroidea e per fornire uno screening per i sei tipi di interferenze sopra menzionati, è stato definito un algoritmo di rilevazione che dovrebbe facilitare la loro identificazione nella pratica clinica (17). Infatti, in una popolazione di oltre 150 pazienti, almeno il 50% delle interferenze documentate nei saggi di valutazione della funzionalità della tiroide ha portato a diagnosi errate e/o gestione inappropriata, compresa la prescrizione di un trattamento non necessario (con effetti avversi in alcune situazioni), soppressione o modifica inappropriata di un trattamento in corso o l'uso di esami complementari non necessari, come una scansione tiroidea con Iodio¹²³ (17).

Dunque, per migliorare il processo diagnostico è necessaria una forte interazione tra medico e laboratorio per evitare gli errori analitici ed il loro possibile impatto clinico (19).

IL LABORATORIO DI DOMANI: LA DIAGNOSTICA INTEGRATA

Il progresso tecnologico ha modificato l'essenza della Medicina di Laboratorio, indirizzandola verso una nuova dimensione, in cui l'approccio multidisciplinare e la diagnosi integrata rappresentano il processo diagnostico che è centrato sul paziente. In particolare, gli

¹Su questo importante tema è stato prodotto un Documento SIBioC: Interferenza da biotina negli immunodosaggi: raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA). *Biochim Clin* 2019.10.19186/BC_2019.010

esami di laboratorio costituiscono un valido supporto per identificare il paziente fragile (20), mentre i *Point of Care Testing* (POCT) sono strumenti indispensabili nei contesti dei laboratori nelle zone di crisi. Tuttavia, alcune variabili, tra cui la validità del dato, il rischio e l'errore, rappresentano aspetti critici ed il punto di partenza verso un laboratorio solido e competitivo.

La qualità, l'errore e la gestione del rischio in medicina di laboratorio

Gli errori diagnostici sono riportati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) all'ottavo posto nella lista dei dieci eventi più importanti in materia di sicurezza del paziente (21). L'errore è definito "diagnostico" quando determina un ritardo o un errore nella diagnosi o quando conduce ad un quadro clinico che non permette di formulare alcuna diagnosi. In molti casi, se non intercettato tempestivamente, l'errore diagnostico conduce ad un esito negativo per il paziente. Fattori legati al sistema (processi mal progettati, sistemi di qualità inadeguati, risorse e personale ridotto) e fattori cognitivi (formazione carente/inadeguata, mancata capacità di sintesi, disattenzione, stress, e così via) sono alla base degli errori diagnostici in Medicina di Laboratorio (22). Negli ultimi decenni, l'utilizzo diffuso della tecnologia per garantire la sicurezza del paziente, si è rivelato molto efficace nella riduzione di questi errori, basti pensare all'utilizzo di barcode e di braccialetti identificativi per la riduzione dell'errore di identificazione del paziente. Ciononostante, il fattore cognitivo resta la principale causa di errore diagnostico. A tal proposito, l'OMS propone l'adozione di interventi educativi come prima strategia di abbattimento dell'errore. In Italia, la formazione dei giovani professionisti di laboratorio in materia di qualità, errore e gestione del rischio resta ancora legata alla attenzione delle diverse scuole di specializzazione oppure di specifici dirigenti particolarmente sensibili verso questi temi. Il decreto interministeriale 68/2015 che regola in materia di ordinamenti didattici delle scuole di specializzazione di area sanitaria, infatti, non riporta questi temi tra gli obiettivi formativi. A livello Europeo, il Syllabus formulato dall'EFLM, include la qualità, la salute e la sicurezza del paziente tra gli aspetti fondamentali sui quali il giovane professionista di laboratorio deve essere formato affinché, possa operare come leader e partecipare alla trasformazione del servizio come servizio di qualità (23). L'OMS ha, invece, prodotto, già nel 2011, un manuale del percorso formativo del giovane professionista sulla sicurezza del paziente, tradotto in diverse lingue (21) ed organizza una serie di incontri volti, oltre che alla formazione, anche alla creazione e diffusione di una cultura orientata alla prevenzione e gestione del rischio. Tra questi, di grande risonanza, l'ultimo incontro tenutosi a Firenze nel settembre 2018, in collaborazione con il Centro Gestione Rischio Clinico e Sicurezza del Paziente della Regione Toscana, ed interamente dedicato alle nuove generazioni di medici e specializzandi, che ha visto presenti oltre 200

specializzandi provenienti da 30 diversi Paesi. La formazione delle nuove generazioni su queste tematiche e la cultura orientata alla sicurezza del paziente sono elementi fondamentali per la riduzione dell'errore nel laboratorio del domani. Ai fini della salute e sicurezza del paziente, non si può comunque prescindere dall'adozione di sistemi di gestione della qualità e dall'implementazione di specifiche metodologie di gestione del rischio e l'utilizzo di indicatori di qualità applicati a tutte le fasi del processo, non solo quella analitica ma anche quelle extra-analitiche.

Chi ben comincia.... gli errori in fase pre-analitica

La fase preanalitica comprende tutti i processi dalla raccolta alla gestione del campione biologico, prima che esso sia fisicamente analizzato nei laboratori clinici. Rientrano in questa fase: la raccolta delle informazioni cliniche, la preparazione del paziente, la raccolta del campione biologico, la gestione del trasporto del campione e il trattamento del campione prima dell'analisi. Questi diversi aspetti nell'ambito del processo diagnostico hanno, da sempre, posto l'accento sulla necessità di standardizzare le procedure, in modo da limitare le possibili fonti di variabilità ed errore. I dati della letteratura scientifica dimostrano inequivocabilmente che la principale fonte di errore nella medicina di laboratorio è imputabile alla fase preanalitica (dal 40 al 70% degli errori) (24). In linea generale, il laboratorio di analisi ha la necessità di analizzare un campione biologico che sia realmente indicativo dello stato clinico del paziente, al momento della formulazione del quesito diagnostico e, quindi, non influenzato da possibili variabili che ne possano alterare la qualità, prima e dopo la fase della sua raccolta. Studi rivolti alla caratterizzazione degli errori nell'ambito della fase preanalitica hanno rivelato che problemi incorsi durante la raccolta del campione hanno un ruolo determinante. Fra le cause di non idoneità del campione le principali sono: presenza di emolisi (54%), campione insufficiente (21%), non idoneo per altra causa (13%) e coagulato (5%). Globalmente, campioni non idonei per qualità o quantità incidono fino al 60% dei campioni non processati (25). L'importanza di questo punto è, altresì, dimostrata dal fatto che le società scientifiche di Medicina di Laboratorio ritengono opportuno un intervento atto a limitare le incertezze in quest'ambito, uniformando ed armonizzando contestualmente i comportamenti dei differenti laboratori. La predisposizione di indicatori extra-analitici di qualità e la revisione di processi correlati a questi indicatori può determinare significative riduzioni dell'errore e dei costi, umani ed economici, ad esso associati (26). L'importanza di monitorare, prevenire e correggere (ove possibile) questi errori è giustificata dalla necessità di implementare standard di qualità nella visione della qualità globale e nella consapevolezza che un errore nella filiera della diagnostica in vitro ha ricadute considerevoli nella gestione del paziente.

Medicina di laboratorio nelle zone di crisi: impiego dei POCT negli ospedali da campo militari

Il *College of American Pathologists (CAP)* definisce i POCT come *“testing that is performed near or at the site of a patient with the result leading to a possible change in the care of the patient.”* Si tratta di un sistema che permette di analizzare i campioni biologici di un paziente al di fuori del laboratorio analisi e, in genere, tale analisi viene eseguita da personale professionalmente non formato nei settori del laboratorio clinico. L'obiettivo del POCT è quello di realizzare il massimo beneficio per il paziente, con il minimo rischio e ad un ragionevole costo, ottimizzando i percorsi diagnostici e consentendo una più tempestiva decisione medica (27). Per quanto riguarda l'esperienza di utilizzo dei POCT negli Ospedali da campo militari, bisogna innanzitutto considerare quali sono alcune delle principali problematiche delle aree di crisi, ovvero le limitazioni di accesso delle strutture sanitarie, le criticità in termini di trasporti (spostamenti spesso consentiti solo con vettore elicotteristico), la mancanza di approvvigionamenti idrici, così come quella della corrente elettrica; bisogna altresì considerare che, spesso, la permanenza nello stesso posto è estremamente difficoltosa da realizzare e garantire per lunghi periodi.

Nella scelta della migliore strumentazione di laboratorio con cui operare quotidianamente, durante una fase di attenta pianificazione logistica, bisogna tenere in grande considerazione tutte quelle che possono rivelarsi potenziali fonti di stress ambientale, in una ottica di ottimale prestazione strumentale. Questo perché, in determinati contesti, sia per fattori quali l'elevata temperatura o l'altissimo tasso di umidità, particolari strumenti potrebbero risultare suscettibili a tali condizioni estreme e, pertanto, potrebbero non garantire una piena funzionalità o comunque non soddisfare standards analitici adeguati [28, 29]. Quindi, optare per strumenti estremamente efficienti e performanti da un punto di vista analitico, ma non sufficientemente robusti e collaudati, potrebbe rivelarsi una scelta quanto mai controproducente in determinate situazioni, determinando gravi disagi in termini di gestione strumentale e capacità assistenziale.

Il laboratorio avanzato per lo studio delle malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morte al mondo. Il substrato fisiopatologico dell'infarto del miocardio è rappresentato dall'aterosclerosi delle arterie coronarie. È ormai noto in letteratura che uno dei principali fattori di rischio di aterosclerosi è la dislipidemia e in particolare un alterato rapporto ApoB/ApoA1. L'apolipoproteina B è la principale proteina costituente le lipoproteine a bassa densità, le LDL, che normalmente vengono misurate di routine all'interno del profilo lipidico nei laboratori di biochimica clinica. Le evoluzioni delle tecniche di laboratorio hanno permesso

l'identificazione ed la misura di altri tipi di LDL di particolare interesse clinico, quali le LDL piccole e dense (sdLDL) e le LDL ossidate (oxLDL) (30). Recenti studi, infatti, hanno focalizzato l'attenzione sulle sdLDL, dimostrando che i pazienti con cardiopatia ischemica presentavano in circolo LDL con dimensioni significativamente più piccole rispetto ai controlli di pari età, sesso ed etnia. Questo sottotipo di LDL è risultato, quindi, essere un importante predittore di infarto del miocardio e di complicanze ad esso correlate (31).

Si ritiene infatti che le sdLDL siano particolarmente aterogeniche. Possiedono, infatti, un'elevata capacità di permeare l'endotelio vascolare, dovuta alla loro esigua taglia, e una diminuita affinità per il recettore delle LDL che ne permetterebbe l'immagazzinamento a livello cellulare. Hanno, inoltre, un'aumentata suscettibilità all'ossidazione che le porta a trasformarsi in oxLDL, che sono responsabili dell'attivazione dei meccanismi della chemiotassi, della penetrazione di cellule infiammatorie a livello subendoteliale e, quindi, della formazione della placca aterosclerotica. È stato anche documentato che le sdLDL vengono degradate più lentamente rispetto alle lipoproteine a densità intermedia rimanendo più a lungo nella circolazione sanguigna. Nel gruppo delle LDL, le sdLDL e la loro forma ossidata, le oxLDL rivestono, dunque, un ruolo preminente nei meccanismi di formazione della placca aterosclerotica e, quindi, elevati livelli plasmatici di questi sottotipi di lipoproteine contenenti Apo B sono associati ad una maggiore incidenza di sindromi coronariche acute. Le tecniche di medicina di laboratorio sono fondamentali per consentire una corretta determinazione delle sdLDL e delle oxLDL. La biochimica clinica può sempre di più avere un ruolo cruciale nella diagnosi precoce di aterosclerosi coronarica e, ancora di più, per monitorare nel tempo i livelli di sdLDL e di oxLDL in seguito a modifiche dello stile, quali un aumento dell'esercizio fisico o un regime dietetico (32), o approcci farmacologici per ridurre il rischio cardiovascolare (33).

YOUNG SCIENTISTS: GLI SPECIALISTI DI DOMANI

I giovani professionisti e ricercatori in Medicina di Laboratorio affrontano molte sfide durante la loro carriera. Ottenere una buona formazione è solo il primo passo; per riuscire davvero, è necessario acquisire una serie di competenze multidisciplinari che abbracciano non solo un particolare campo medico, ma anche la capacità di collegarlo ad un quadro più ampio di conoscenze. Nell'era della globalizzazione, è, inoltre, indispensabile comprendere l'importanza del collegamento in rete e della cooperazione con i colleghi di tutto il mondo. Il team è “un gruppo di persone che lavora attraverso uno sforzo collettivo verso un obiettivo comune.” Un efficace lavoro di squadra è un ingrediente essenziale per qualsiasi successo organizzativo. I team di successo possono aiutare a trasformare un'organizzazione, aumentare i risultati e realizzare

obiettivi organizzativi. Ci sono diversi elementi cruciali nel lavoro di squadra, come la composizione del gruppo, il lavorare insieme, la motivazione e la leadership all'interno del gruppo, che contribuiscono a sviluppare, con successo, risultati di qualità. È fondamentale sostenere le inestimabili capacità, conoscenze, esperienze e diversità del personale per sviluppare una nuova cultura e una nuova visione.

Organizzazioni nazionali ed internazionali come SIBioC e IFCC stanno promuovendo questi valori attraverso gruppi di lavoro e *task force* che riuniscono persone con idee simili provenienti da tutto il mondo.

A livello internazionale, la *Task Force-Young Scientists* (TFYS) è stata costituita nel 2010 dall'IFCC per promuovere il contributo essenziale della Medicina di Laboratorio per l'assistenza sanitaria. Inoltre, la TFYS sta lavorando con impegno per aiutare la nuova generazione ad affrontare le sfide nel campo della Medicina di Laboratorio, mediante la collaborazione con le altre società nazionali e internazionali. IFCC-TFYS è in grado di superare le barriere geografiche e culturali e ha creato un forte gruppo di supporto per giovani scienziati che coinvolge più di 30 paesi membri dell'IFCC a livello mondiale. Ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di moderne tecnologie informatiche e dei social media, quali Facebook, Twitter, Linked In e altri, che permettono di stabilire connessioni tra i giovani professionisti e facilitare la loro comunicazione continua.

Inoltre, la TFYS promuove importanti iniziative di formazione, mediante l'organizzazione di workshop didattici, programmi di mentoring, corsi di formazione e webinar per apprendere le prospettive ed i principi di gestione e leadership di laboratorio, quali "Indagine IFCC-TFYS", "Programma di mentoring IFCC-TFYS", "Opuscolo di ricerca", "Young Scientists Awards & Grants", Webinar e Lab-Surf.

A livello nazionale, SIBioC ha istituito nel 2017 il Gruppo di Studio Young Scientists (GdS SIBioC-YS), con l'obiettivo di favorire la creazione di meccanismi di cooperazione e programmi di formazione tra giovani specialisti in Medicina di Laboratorio. Le attività principali sono la formazione e il training, attraverso l'organizzazione di convegni ed incontri scientifici, dedicati a giovani professionisti. Il programma delle conferenze include una lettura magistrale di un eminente scienziato della scena internazionale e le moderazioni delle singole sessioni coordinate da giovani professionisti congiuntamente ad alcuni mentori senior. I relatori sono giovani ricercatori che hanno raggiunto risultati importanti nei campi della Medicina di Laboratorio e le cui comunicazioni orali sono state selezionate tra gli abstract inviati. Grande enfasi viene data anche agli eventi sociali, solitamente organizzati ai margini della conferenza scientifica, che incoraggiano la formazione di un gruppo affiatato.

Comunità internazionale di young scientists: la piattaforma *Lab-surfing*

In una professione in progressiva evoluzione, i

ricercatori sono alla continua ricerca di opportunità di apprendimento. I programmi di scambio diventano essenziali e i ricercatori usano sempre più questo tipo di progetti. *Lab-surfing* è una piattaforma internazionale di comunicazione e connessione tra giovani che lavorano nell'ambito della Medicina di Laboratorio (per la consultazione ed iscrizione collegarsi al sito <https://www.lab-surfing.com>). La piattaforma sfrutta le potenzialità del web e degli strumenti informatici per creare connessioni e reti tra i giovani partecipanti. *Lab-surfing* è stato sviluppato a partire dal 2015, grazie ad un progetto promosso dalla IFCC-TFYS. Il *Lab-surfing*, in costante crescita, ha tre obiettivi principali: connettere giovani professionisti di laboratorio come specializzandi e ricercatori, migliorare la comunicazione tra loro, e facilitare i programmi di scambio.

È possibile utilizzare *Lab-surfing* per trovare colleghi in diverse città, partecipare a programmi di scambio per periodi di formazione, cercare informazioni e opportunità in numerosi laboratori e in diverse città, discutere con altri scienziati. Il sistema è semplice ed intuitivo, e permette una ricerca per area geografica oppure per settore scientifico.

Sono presenti oltre 600 utenti, provenienti da 66 Paesi, per il 90% con una età inferiore a 40 anni. Negli ultimi tre anni, il numero di iscritti è aumentato in modo considerevole, grazie alle importanti iniziative di promozione ed alla attività della IFCC-TFYS. In particolare, l'Italia si trova all'11ª posizione tra i Paesi membri dell'IFCC per numero di utenti iscritti alla piattaforma (Figura 2).

Il futuro della Medicina di Laboratorio è nelle mani di giovani professionisti che stanno imparando a navigare nel complicato mondo della medicina moderna, e con gli strumenti giusti, potranno essere artefici di grandi conquiste e di importanti traguardi.

CONCLUSIONI

Siamo i testimoni di importantissime innovazioni tecnologiche in ambito della Medicina di Laboratorio che stanno producendo una nuova visione dei servizi sanitari. I giovani professionisti e ricercatori devono essere preparati a cogliere le innumerevoli opportunità ed a valutare i rischi che questa innovazione pone.

La SIBioC, da sempre attenta a favorire l'innovazione, sostenendo le attività del Gruppo YS, intende stimolare e favorire la crescita scientifico-culturale dei soci più giovani perché supportare il rinnovamento culturale significa dare forma al talento, alle competenze e alla leadership dei professionisti della Medicina di Laboratorio di domani.

Solo una costante preparazione scientifica, lo scambio di esperienze ed idee con i propri colleghi attraverso piattaforme e programmi di formazione e lo scambio culturale permetterà loro di uscire vittoriosi da questa sfida.

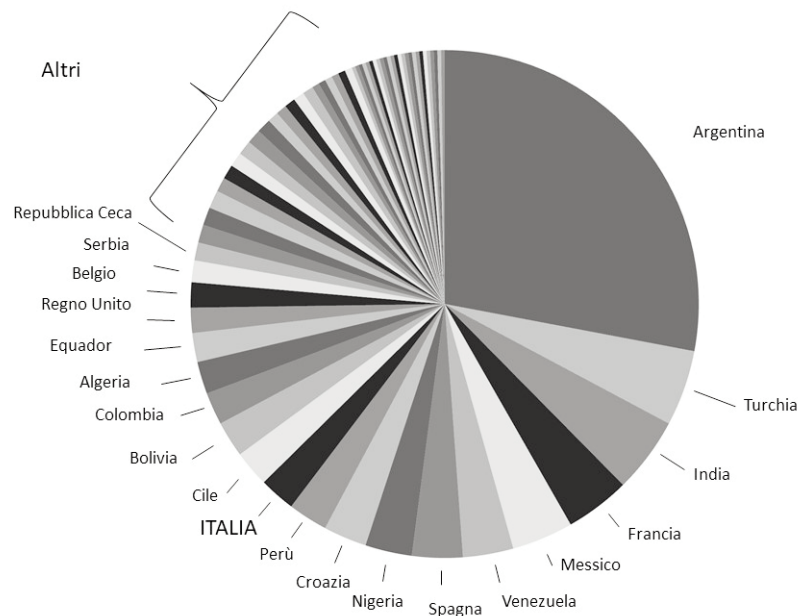


Figura 2
Partecipazione alla piattaforma Lab Surfing. Numerosità di iscritti alla piattaforma, in base alla Nazione di appartenenza.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Price CP, St John A. Innovation in healthcare. The challenge for laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2014;427:71-8.
- Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019;489:49-52.
- IOM (Institute of Medicine). Essential Health Benefits: Balancing Coverage and Cost. Washington, DC: The National Academies Press, 2012.
- Ialongo C, Porzio O, Giambini I, et al. Total automation for the core laboratory: improving the turnaround time helps to reduce the volume of ordered STAT tests. *J Lab Autom* 2016;21:451-8.
- Ialongo C, Pieri M, Bernardini S. Smart management of sample dilution using an artificial neural network to achieve streamlined processes and saving resources: the automated nephelometric testing of serum free light chain as case study. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:231-6.
- Ialongo C, Pieri M, Bernardini S. Artificial neural network for total laboratory automation to improve the management of sample dilution. *SLAS Technol* 2017;22:44-9.
- Sancesario GM, Bernardini S. Alzheimer's disease in the omics era. *Clin Biochem* 2018;59:9-16.
- Formosa A, Piro MC, Docimo R, et al. Salivary miRNAome profiling uncovers epithelial and proliferative miRNAs with differential expression across dentition stages. *Cell Cycle* 2011;10:3359-68.
- Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. *Clin Chim Acta* 2017;473:147-56.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002;3:r0034.1-0034.11
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1:1559-82.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30:207-10.
- Nuvolone M, Merlini G. Systemic amyloidosis: novel therapies and role of biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2017;32:770-80.
- Shlush LI, Hershkovitz D. Clonal evolution models of tumor heterogeneity. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015:e662-5.
- De Luca F, Rotunno G, Salvianti F, et al. Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:p.26107-19.
- Cariati F, Borrillo F, Shankar V, et al., Dissecting intra-tumor heterogeneity by the analysis of copy number variations in single cells: the neuroblastoma case study. *Int J Mol Sci* 2019;20: pii:E893. .
- Favresse J, Burlacu MC, Maiter D, et al. Interferences with thyroid function immunoassays: clinical implications and detection algorithm. *Endocr Rev* 2018;39:830-50.
- Katzman BM, Lueke AJ, Donato LJ, et al. Prevalence of biotin supplement usage in outpatients and plasma biotin concentrations in patients presenting to the emergency department. *Clin Biochem* 2018;60:11-6.
- Plebani M. Analytical quality: an unfinished journey. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:357-9.

20. Koch G, Belli L, Giudice TL, et al. Frailty among Alzheimer's disease patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12:507-11.
21. http://www.who.int/features/factfiles/patient_safety/en/ (Ultimo accesso: Gennaio 2019).
22. Plebani M. System-related and cognitive errors in laboratory medicine. *Diagnosis* 2018;5:191-6.
23. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 - 2018. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1846-63.
24. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, et al. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002;48:691-8.
25. Lippi G, Banfi G, Church S, et al. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med* 2015;53:357-70.
26. Sciacovelli L, Lippi G, Sumarac Z, et al. Quality Indicators in Laboratory Medicine: the status of the progress of IFCC Working Group "Laboratory Errors and Patient Safety" project. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:348-57.
27. Di Serio F, Trenti T, Carraro P, et al. Raccomandazioni per l'implementazione e la gestione del "point-of-care testing" (POCT). *Biochim Clin* 2011;35:242-52.
28. Lam M, Louie RF, Curtis CM, et al. Short-Term thermal-humidity shock affects point-of-care glucose testing: implications for health professionals and patients. *J Diabetes Sci Technol* 2014;8:83-8.
29. Louie RF, Ferguson WJ, Curtis CM, et al. Vulnerability of point-of-care test reagents and instruments to environmental stresses: implications for health professionals and developers. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:325-35.
30. De Lorenzo A, Bernardini S, Gualtieri P, et al. Mediterranean meal versus Western meal effects on postprandial ox-LDL, oxidative and inflammatory gene expression in healthy subjects: a randomized controlled trial for nutrigenomic approach in cardiometabolic risk. *Acta Diabetol* 2017;54:141-9.
31. Acconcia MC, Caretta Q, Romeo F, et al. Meta-analyses on intra-aortic balloon pump in cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction may provide biased results. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:2405-14.
32. Merra G, Gratteri S, De Lorenzo A, et al. Effects of very-low-calorie diet on body composition, metabolic state, and genes expression: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:329-45.
33. Perrone MA, Babu Dasari J, Intorcchia A, et al. Efficacy and safety of dronedarone in patients with amiodarone-induced hyperthyroidism: a clinical study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:8502-8.

Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare

Federica Di Maggio^{1,2}, Francesca Borrillo^{1,2}, Federica Cariatì^{3,4}, Rossella Tomaiuolo^{1,2,4}, Valeria D'Argenio^{1,2,4}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via G. Salvatore 486, Napoli

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II

³Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II

⁴KronosDNA s.r.l., spin-off accademico dell'Università Federico II di Napoli

ABSTRACT

Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part II: laboratory methodologies. This document represents the second part of a glossary on molecular biology. In particular, the main laboratory techniques for molecular biology are described. Indeed, recent technological advances made available a number of technologies featured by higher accuracy and sensitivity that are becoming commonly used in routine molecular diagnostics.

Aiming to support less experienced readers, the terms related to the main molecular biology techniques are listed herein. For each term the corresponding English version is reported (see also the complete list, both in Italian and in English alphabetical order, reported in the Appendix). In addition, for some of the terms, a link to articles published in *Biochimica Clinica*, where they have been used, is reported.

INTRODUZIONE

La biologia molecolare sta assumendo un ruolo sempre più rilevante nell'ambito della medicina di laboratorio e della diagnostica di laboratorio. Dopo la pubblicazione della prima parte del Glossario, relativa ai termini di base di biologia molecolare (1), si procede, in questa seconda parte, alla rassegna delle principali metodiche di biologia molecolare attualmente in uso (2,3).

Il recente sviluppo tecnologico, infatti, ha interessato anche il settore delle biotecnologie: tecnologie sempre più all'avanguardia e con un sempre più elevato livello di sensibilità e accuratezza, sono entrate o stanno entrando nella pratica laboratoristica di routine.

Allo scopo di fornire un rapido riferimento per le principali metodiche di biologia molecolare, saranno di seguito descritti i termini maggiormente utilizzati. Inoltre, per facilitare il lettore meno esperto, per ciascun termine è riportato il nome corrispondente in lingua inglese (vedi anche l'elenco in ordine alfabetico riportato in Appendice) e, dove disponibile, è riportato il link a lavori pubblicati su *Biochimica Clinica* negli ultimi anni, nei quali il termine viene utilizzato in modo da fornire un collegamento concreto.

AGGLUTINAZIONE (AGGLUTINATION)

Processo consistente nella combinazione di anticorpi specifici con antigeni presenti su cellule o virus che provoca la formazione di aggregati insolubili.

AMPLIFICAZIONE ALLELE SPECIFICA (AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM - ARMS)

Il metodo ARMS è usato per verificare se in un certo *locus* è presente una variante di sequenza puntiforme nota. Si basa sull'impiego di primers sequenza-specifici: in particolare, si eseguono due reazioni d'amplificazione sullo stesso campione di DNA ma, in una è utilizzata la coppia di primer che riconosce la sequenza *wild type* (WT), e nell'altra la coppia di primer che riconosce la sequenza mutata. La specificità risiede nei primer in quanto di ogni coppia uno solo è complementare alla sequenza da indagare. Se il DNA è mutato, solo il primer complementare alla mutazione puntiforme può legarsi ed essere incorporato negli amplificati, mentre se la sequenza è normale viene

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, E-mail dargenio@ceinge.unina.it; tel 081 3737909

Ricevuto: 19.03.2019

Revisionato: 10.05.2019

Accettato: 28.05.2019

Pubblicato on-line: 02.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.052

incorporato il primer WT.

La presenza o assenza del prodotto di amplificazione viene controllata mediante elettroforesi su gel d'agarosio o elettroforesi capillare marcando i prodotti con fluorocromi diversi.

AMPLIFICAZIONE DEL DNA (DNA AMPLIFICATION)

È una tecnica di biologia molecolare che permette di ottenere un elevato numero di copie di uno specifico frammento di DNA mediante reazione a catena della polimerasi o PCR (vedi).

AMPLIFICAZIONE DELL'INTERO GENOMA (WHOLE GENOME AMPLIFICATION - WGA)

L'amplificazione dell'intero genoma o WGA comprende una serie di metodiche che hanno lo scopo di ottenere una concentrazione elevata di DNA genomico partendo da una quantità limitata.

(D'Argenio V, Tomaiuolo R, Cariati F. Whole genome amplification on single cell. Biochim Clin 2016;40:293-301)

AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP)

Tecnica per l'identificazione di varianti del DNA che sono in grado di determinare l'abolizione o la creazione di siti di restrizione. L'AFLP, infatti, prevede la digestione del DNA genomico con uno o più enzimi di restrizione, seguita dall'amplificazione selettiva delle regioni genomiche target e dalla successiva separazione elettroforetica su gel per visualizzare le bande ottenute tramite autoradiografia o fluorescenza. L'analisi della lunghezza dei frammenti ottenuti in ciascun campione permetterà di discriminare la presenza/assenza di una specifica variante nella sequenza del DNA. La corsa su gel avviene utilizzando un DNA digerito di riferimento (ladder).

ASO TESTING (ALLELE SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE - ASO)

Tecnica per l'identificazione di una specifica mutazione attraverso l'ibridazione del DNA target con un oligonucleotide sintetico (ASO) complementare all'allele mutato e marcato con una sostanza radioattiva o fluorescente o con un metodo enzimatico.

ASSAY FOR TRANSPOSASE ACCESSIBLE CHROMATIN SEQUENCING (ATAC-SEQ)

È un metodo alternativo al DNase-seq (vedi) utilizzato per l'identificazione di regioni aperte (accessibili) della cromatina, che rappresentano elementi di regolazione del DNA. L'ATAC-seq utilizza una transposasi ingegnerizzata ad elevata attività (Tn5)

in grado di tagliare il DNA genomico in corrispondenza delle regioni accessibili, e contemporaneamente di legare specifici primer universali (adattatori), necessari per il successivo sequenziamento, alle estremità dei frammenti di DNA genomico ottenuti (tagmentation). I frammenti ottenuti vengono amplificati mediante PCR in modo da ottenere una libreria da sequenziare utilizzando piattaforme per il sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi).

BANDEGGIO DEI CROMOSOMI (CHROMOSOME BANDING)

Tecniche di colorazione che permettono di distinguere, in ciascun cromosoma, regioni con diversa intensità di colorazione determinando una caratteristica successione di bande lungo l'asse principale di ciascun cromosoma. In questo modo, è possibile riconoscere ciascuna coppia di cromosomi e identificare la presenza di eventuali alterazioni cromosomiche. Le tecniche di bandeggio prevedono la denaturazione del DNA o, in alternativa, una fase di digestione enzimatica. Successivamente, si utilizzano coloranti specifici in grado di legare il DNA con elevata affinità per regioni ricche in AT (adenina e timina) o GC (guanina e citosina). In base al tipo di trattamento effettuato, si distinguono diversi tipi di bandeggio detti G (digestione enzimatica e colorazione con Giemsa), Q (digestione enzimatica e colorazione con Quinacrina), R (denaturazione ad elevata temperatura e colorazione con Giemsa) e C (denaturazione in soluzione di idrossido di bario e colorazione con Giemsa).

BEAMING PCR

Tecnica di Digital PCR (vedi) che combina l'amplificazione in emulsione con biglie magnetiche alla citofluorimetria e permette l'identificazione e la quantizzazione di varianti rare del DNA. Pertanto, tale metodica è utilizzata in campo oncologico per l'identificazione di mutazioni somatiche a bassa frequenza, nel DNA circolante del paziente analizzato.

BLOTTING (BLOTTING)

Tecnica di rivelazione basata sulla separazione di macromolecole mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio o di poliaccrilamide e successivo trasferimento su una membrana di nylon o di nitrocellulosa. Le macromolecole così fissate possono essere rilevate mediante l'uso di sonde fluorescenti o radioattive.

CARIOTIPO (KARYOTYPE)

Il cariotipo o analisi cromosomica è un test in grado di valutare la struttura ed il numero dei cromosomi di un individuo con lo scopo di ricercare eventuali anomalie quali/quantitative. I cromosomi vanno sottoposti a tecnica di bandeggio (vedi). Grazie all'utilizzo del

microscopio ottico è possibile valutare la lunghezza, la posizione dei centromeri, il pattern di bandeggio, differenze tra i cromosomi ed eventuali caratteristiche fisiche.

L'esecuzione di un cariotipo richiede l'isolamento di cellule dal campione da analizzare (ad esempio i linfociti nel sangue periferico). Le cellule isolate vengono messe in coltura (vedi), bloccate in metafase e trattate con sostanze in grado di colorare i cromosomi in modo che possano essere valutati al microscopio.

CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION SEQUENCING (CHIP SEQ)

È un metodo che permette di studiare le interazioni tra proteine e DNA combinando l'immunoprecipitazione della cromatina o ChIP (vedi) con il sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi), al fine di individuare e sequenziare i siti di legame al DNA di una specifica proteina di interesse.

CITOMETRIA A FLUSSO (FLOW CYTOMETRY)

Metodica di laboratorio che permette di contare e analizzare cellule in sospensione utilizzando una luce laser. Le cellule vengono fatte fluire nello strumento (citometro) e colpite dal raggio laser; diversi rilevatori, strategicamente posizionati, captano la luce diffusa dalla cellula in transito fornendo all'operatore una serie d'informazioni sulla morfologia di ogni singola cellula analizzata (vitalità, dimensioni, complessità, fenotipo, e quant'altro). Inoltre, utilizzando anticorpi monoclonali legati a differenti fluorocromi, è anche possibile identificare cellule che esprimono uno o più marcatori di membrana specifici (citofluorimetria). Tale tecnica può essere anche accoppiata a sistemi di conta di target molecolari, come avviene nella tecnologia BEAMing PCR (vedi).

(Flow cytometry for screening acute urinary tract infections and differentiation between Gram positive and Gram negative bacteria. Biochim Clin 2014;38:625-9)

CLONAGGIO (CLONING)

Insieme di tecniche di biologia molecolare che, attraverso l'assemblaggio di molecole ricombinanti, permettono di ottenere molte copie identiche di una sequenza nucleotidica mediante l'inserimento in un opportuno vettore. Clonando un gene è possibile, ad esempio, ottenere notevoli quantità di un'informazione genetica, presente in duplice copia in un organismo diploide, per studiarne le caratteristiche a livello molecolare oppure per trasferirlo da un organismo a un altro.

CLONAZIONE (CLONATION)

Insieme di tecniche che permettono la produzione di una o più repliche genetiche di una cellula o di un intero organismo. Generalmente, si utilizza il nucleo di una

cellula somatica prelevata da un organismo multicellulare da clonare e che viene trasferito in una cellula uovo della stessa specie, ma privata del nucleo, per generare uno o più individui geneticamente identici. Si distinguono due tipi di clonazione: riproduttiva mediante la quale si ottengono individui geneticamente identici ad altri originati attraverso il medesimo processo o già presenti in natura, e terapeutica utilizzata per la sostituzione di tessuti od organi difettivi.

COLTURE CELLULARI (CELL CULTURE)

Insieme di metodiche di laboratorio attraverso le quali è possibile far crescere e proliferare, in ambienti controllati, cellule procariotiche o eucariotiche. Una coltura cellulare prevede l'isolamento di uno specifico gruppo di cellule seguito da un'incubazione su terreni e fattori di crescita specifici per ciascuna tipologia di cellula che si intenda coltivare.

COMPLEMENTAZIONE IN VITRO (IN VITRO COMPLEMENTATION)

Saggio per verificare se due mutazioni recessive sono in cis (ossia sullo stesso allele) o in trans (ossia ciascuna su un allele diverso) in base all'attività della proteina e al fenotipo che ne deriva. L'assenza di attività della proteina, associata al fenotipo mutato, indica assenza di complementazione e che le due mutazioni sono ciascuna su un allele diverso, determinando due prodotti non funzionali. Viceversa, la presenza di attività residua della proteina, associata al fenotipo WT, indica la presenza di complementazione e che le due mutazioni sono sullo stesso allele, determinando un allele non funzionale compensato dall'altro che resta funzionale.

CRISPR/CAS9

Tecnica utilizzata per l'editing del genoma (vedi) che sfrutta la capacità dell'endonucleasi Cas9 di introdurre tagli all'interno della doppia elica del DNA. L'attività di taglio della proteina Cas9 viene programmata utilizzando una molecola di RNA, precedentemente scelta dall'operatore, che funge da guida e si associa a delle sequenze di DNA bersaglio, guidando i tagli della regione interessata. A questo punto, grazie alla ricombinazione omologa, la cellula provvederà a riparare la rottura utilizzando un DNA esogeno.

Grazie a questa tecnica è possibile, ad esempio, eliminare sequenze di DNA dannose dal genoma bersaglio oppure sostituire delle sequenze, correggendo mutazioni o varianti patogenetiche che sono causa di malattie.

CRISTALLOGRAFIA A RAGGI X (X-RAY CRYSTALLOGRAPHY)

Tecnica per determinare la disposizione

tridimensionale degli atomi di una molecola basata sullo schema di diffrazione di raggi X che passano attraverso il reticolo atomico di un cristallo. Permette di studiare la struttura e il funzionamento di molecole quali, ad esempio, DNA e proteine.

CROMATOGRAFIA (CHROMATOGRAPHY)

Tecnica biochimica in cui le componenti di una miscela sono separate in base a carica, dimensioni o altre proprietà, che ne determinano la distribuzione attraverso 2 fasi: una in movimento e una stazionaria. In base al tipo di fase utilizzata si distinguono differenti tipi di cromatografie: gascromatografia (GC), cromatografia liquida (LC), cromatografia su strato sottile (TLC), cromatografia a scambio ionico (IEC), cromatografia di esclusione molecolare (EC). In questi gruppi è possibile classificare ulteriormente le tecniche; ad esempio, la LC si suddivide in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e cromatografia liquida classica.

(Sviluppo di un metodo in cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem per valutare la permeabilità intestinale nella pratica clinica. [Biochim Clin 2017;41:60-3](#))

(Validazione del dosaggio delle metanefrine plasmatiche mediante cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem. [Biochim Clin 2017;41:50-9](#))

DEP-ARRAY

Il DEP-array è una nuova tecnica in grado di selezionare, isolare e raccogliere singole cellule (4); utilizza un chip microelettrico costituito da un elevato numero di elettrodi e sensori tra loro indipendenti. Ciascun chip può analizzare fino ad un massimo di 10 000 singole cellule contemporaneamente. Questo dispositivo permette la cattura e la manipolazione di diverse cellule grazie a "trappole" dinamiche dielettroforetiche, generate dal chip di silicone e controllate da un'interfaccia elettronica. Il campione viene caricato sul chip e i sensori sia elettrostatici che ottici elaborano un'immagine pixel, in cui ciascun pixel corrisponde ad un singolo microsito sul chip. In questo modo, è possibile determinare le coordinate di ogni elemento presente sul chip, che vengono poi integrate dal software di controllo permettendo così la selezione delle cellule d'interesse. Le cellule isolate possono essere sottoposte ad ulteriori analisi molecolari.

DIGITAL PCR (DPCR)

Evoluzione della PCR (vedi) che permette di amplificare e quantizzare acidi nucleici. La caratteristica principale della dPCR è che la reazione di amplificazione viene ripartita in un elevato numero di micro-reazioni fisicamente separate (utilizzando piastre, capillari o oli in emulsione) e che, di conseguenza, si amplificano in maniera indipendente. Pertanto, utilizzando primer marcati con sostanze fluorescenti, è possibile contare il

numero di molecole in cui l'amplificazione è avvenuta correttamente. I risultati vengono poi sottoposti ad un calcolo di distribuzione statistica (distribuzione di Poisson), risalendo in questo modo al numero di molecole target presenti nel campione iniziale.

DNA TRANSFER

Vedi Southern blot.

DNASE I HYPERSENSITIVE SITES SEQUENCING (DNASE-SEQ)

Metodo che, sfruttando le tecnologie di sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi), permette di studiare le regioni regolatorie del DNA. Infatti, attraverso il trattamento con la DNasi I, le regioni accessibili della cromatina vengono arricchite dal DNA genomico e sequenziate.

EDITING DEL GENOMA UMANO (GENOME EDITING)

Viene definito editing del genoma umano la capacità di modificare o sostituire parti della sequenza del DNA degli organismi viventi utilizzando diverse tecniche come, ad esempio, la CRISPR/Cas9 (vedi). Generalmente, tali metodiche si basano sull'impiego di cosiddette "forbici molecolari", ossia sistemi in grado di introdurre tagli nella sequenza del DNA e poi inserire, eliminare o sostituire porzioni di questa sequenza con altre. Tali metodiche, pertanto, permettono di correggere eventuali alterazioni della sequenza del DNA (mutazioni) che sono responsabili di uno specifico fenotipo patologico e stanno aprendo nuove importanti prospettive per la terapia genica di diverse patologie.

ELETTROFORESI (ELECTROPHORESIS)

Tecnica analitica che permette di separare molecole elettricamente cariche attraverso il loro passaggio in una matrice a cui viene applicato un campo elettrico. In base alla matrice e al sistema di rilevamento utilizzato si distinguono diverse tipologie di elettroforesi caratterizzate da differenti livelli di sensibilità e accuratezza di rilevamento.

ELETTROFORESI CAPILLARE (CAPILLARY ELECTROPHORESIS)

È un'alternativa all'elettroforesi su gel per la separazione di frammenti di DNA. L'elettroforesi capillare utilizza le cariche ioniche e le forze di frizione per separare diverse molecole in una miscela. A differenza dell'elettroforesi tradizionale, in questa tecnica la separazione si basa sull'eluzione del campione all'interno di un piccolo capillare riempito con un elettrolita in presenza di un campo elettrico. Un rilevatore a UV viene comunemente utilizzato per l'analisi dei risultati.

(Valutazione delle caratteristiche analitiche di un nuovo strumento per l'elettroforesi capillare delle proteine sieriche. Biochim Clin 2014;38:295-301)

ELETTROFORESI SU GEL (GEL ELECTROPHORESIS)

È una tecnica classicamente utilizzata per la separazione di molecole che possiedono gruppi o residui ionizzabili, come gli acidi nucleici e le proteine, in base alla carica elettrica e alle loro dimensioni. L'elettroforesi sfrutta la diversa velocità di migrazione di molecole cariche sotto l'influenza di un campo elettrico; la velocità con la quale le particelle si muoveranno dipenderà dal supporto scelto, dal campo elettrico applicato, dal tampone utilizzato e dalle caratteristiche delle particelle, in funzione del rapporto massa/carica.

Il gel d'agarosio è un supporto gelatinoso, solitamente utilizzato per la separazione di acidi nucleici, che viene preparato attraverso ebollizione in uno specifico tampone. La soluzione, così preparata, è versata in un apposito stampo dove avverrà la gelificazione e dove, con un pettinino verranno ricavati degli appositi spazi, pozzetti, per il caricamento dei campioni. Il gel viene poi immerso in un tampone e, una volta caricati i campioni, verrà applicato un campo elettrico per indurre la migrazione degli acidi nucleici carichi negativamente verso il polo positivo (anodo) in base alla loro massa. Per la rilevazione dei campioni viene utilizzato l'etidio bromuro, molecola fluorescente intercalante del DNA e una lampada UV. Frammenti lineari piccoli migreranno più velocemente di quelli grandi; invece, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente del DNA lineare. In alternativa all'etidio bromuro (agente considerato cancerogeno), possono essere utilizzati altri intercalanti fluorescenti (LC-green, picogreen, SYBR green).

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide, invece, viene maggiormente utilizzata per la separazione di proteine e si ottiene dalla polimerizzazione di molecole di acrilammide mediante formazione di legami crociati in presenza di metilen-bis-acrilammide. Questo gel è formato da due parti: lo *stacking gel* e il *running gel*. Il primo, posto nella parte superiore, è la porzione di gel dove vengono creati i pozzetti di caricamento; il secondo invece è la porzione di gel dove avviene la vera e propria corsa elettroforetica che consente di separare il campione di interesse in base alle sue dimensioni. Alla fine della corsa i campioni verranno resi visibili mediante utilizzo di metodi in grado di colorare le molecole separate.

ELETTROFORESI SU GEL CON GRADIENTE DI DENATURAZIONE - (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS DGGE)

La DGGE è un'elettroforesi su gel di acrilammide in condizioni denaturanti che separa i frammenti di DNA in base alle differenti proprietà di dissociazione o *melting*. In questo modo, è possibile distinguere gli omoduplex (ossia frammenti di DNA perfettamente complementari

tra loro) dagli eteroduplex (ossia frammenti di DNA che presentano almeno un errato appaiamento delle basi tra i due filamenti) e individuare la presenza di varianti del DNA. Tale tecnica è ormai in disuso in quanto poco riproducibile e operatore dipendente.

ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI (NUCLEIC ACID EXTRACTION)

L'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici rappresentano una fase preliminare, fondamentale per la maggior parte delle applicazioni di biologia molecolare, che richiedono una precisa quantità di DNA o RNA con adeguate caratteristiche di purezza e qualità. Indipendentemente dal campione biologico di partenza (che possono richiedere specifici accorgimenti), l'estrazione degli acidi nucleici prevede le seguenti fasi consecutive: la lisi delle cellule, che consente il rilascio degli acidi nucleici; l'inattivazione delle nucleasi cellulari, che previene la degradazione del DNA/RNA; la separazione delle proteine e di tutti i contaminanti che potrebbero interferire con le successive fasi di analisi del campione; il recupero dell'acido nucleico mediante precipitazione e successiva risospensione nel tampone di eluizione finale. Una volta conclusa l'estrazione verrà valutata la qualità e la quantità degli acidi nucleici. Attualmente, esistono diversi kit commerciali che permettono l'estrazione di acidi nucleici a partire da diverse tipologie e quantità di campione biologico, nonché numerosi sistemi di automazione per l'estrazione in parallelo di numerosi campioni.

FINGERPRINTING DEL DNA (DNA FINGERPRINTING)

Insieme di metodiche che, attraverso l'analisi di una serie di specifici marcatori molecolari, permettono di ottenere un profilo univoco, tipico di un individuo, in modo da renderlo riconoscibile e identificare similitudini e differenze rispetto ad altri individui. I marcatori molecolari utilizzati possono essere polimorfismi di sequenza o di lunghezza (STR). Il fingerprinting del DNA viene utilizzato, ad esempio, per valutare profili di compatibilità in caso di trapianto di organi, per l'identificazione di resti umani, nell'identificazione della paternità e in medicina legale.

FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)

Tecnica utilizzata per studiare la struttura di molecole biologiche in rapporto tra loro. In questa metodica, l'emissione da parte di un fluoroforo eccitato (donatore) viene catturata da un secondo fluoroforo (accettore), posizionato vicino al primo, che emette un segnale fluorescente che può essere rilevato dall'operatore. La reazione avviene solo se i due fluorofori sono a distanza ravvicinata. Questa metodica viene utilizzata, ad

esempio, per studiare i cambiamenti conformazionali di una molecola, l'attività delle proteasi e la permeabilità di membrana. Il principio della FRET, inoltre, viene anche sfruttato da alcuni protocolli di real time PCR (vedi) che utilizzano specifiche coppie di primer, ciascuno marcato con uno dei due fluorocromi; solo l'appaiamento corretto dei due primer permetterà ai due fluorofori di trovarsi alla giusta distanza per l'emissione della fluorescenza.

FORMALDEHYDE-ASSISTED ISOLATION OF REGULATORY ELEMENTS SEQUENCING (FAIRE-SEQ)

Metodo che permette di studiare le regioni regolatorie del DNA. Si basa sull'isolamento del DNA non presente nei nucleosomi attraverso trattamento con formaldeide. I frammenti di DNA genomico così arricchiti possono essere sequenziati mediante tecnologie di sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi).

HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS - (HRMA)

Metodica di biologia molecolare che permette di identificare in maniera rapida e accurata variazioni di sequenza presenti in una molecola di DNA a doppio filamento. L'HRMA è un metodo post-PCR basato sull'analisi delle curve di dissociazione (o *melting*) di un prodotto di PCR. In particolare, la regione genomica d'interesse viene amplificata aggiungendo alla reazione di amplificazione molecole fluorescenti in grado di legare il DNA a doppio filamento. Pertanto, durante l'amplificazione si avrà un aumento esponenziale della fluorescenza che corrisponde all'aumento della concentrazione dell'amplicone. Al termine della PCR, il prodotto di amplificazione viene riscaldato gradualmente da circa 50°C fino a 95°C. L'aumento della temperatura determinerà la denaturazione dell'amplicone e, conseguentemente, la riduzione della fluorescenza. L'andamento della fluorescenza in funzione della temperatura rappresenta la curva di *melting*. Dal momento che anche la sostituzione di una singola base nucleotidica è in grado di modificare la dissociazione di un amplicone, l'analisi delle curve di *melting* può essere usata per l'identificazione di queste varianti.

IBRIDAZIONE FLUORESCENTE IN SITU (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION-FISH)

È una tecnica citogenetica che permette di rilevare eventuali alterazioni cromosomiche (presenza o assenza di specifiche regioni di DNA) nei nuclei cellulari durante l'interfase.

Il principio sul quale si basa questa tecnica è l'ibridazione di specifiche sonde (probe), opportunamente marcate con sostanze fluorescenti, ad una sequenza di DNA complementare ad esse; per verificare l'avvenuta ibridazione tra sonda e cromosoma

si utilizzano tecniche di microscopia a fluorescenza.

IBRIDAZIONE GENOMICA COMPARATIVA (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION-CGH)

Tecnica che permette di studiare l'intero genoma di un individuo nella stessa seduta analitica al fine di identificare eventuali alterazioni del numero di cromosomi (aneuploidie o poliploidie) o di identificare alterazioni del numero di copie (*copy number variant* o CNV) di regioni cromosomiche di dimensioni variabili, quale conseguenza di eventi di duplicazione o delezione.

Questa tecnica si basa sull'ibridazione competitiva di due genomi marcati in maniera differente a cromosomi in metafase. I due genomi utilizzati sono, generalmente, il DNA del soggetto in esame (DNA test) e il DNA di un soggetto sano che funge da controllo (*reference DNA*). Durante il processo analitico questi due DNA sono marcati con molecole fluorescenti diverse, generalmente viene utilizzato un fluorocromo rosso per il DNA test e quello verde per il *reference DNA*, in modo da consentirne l'identificazione al termine dell'analisi. Successivamente, i due DNA vengono incubati con i cromosomi in metafase. Il risultato, dopo questa fase di ibridazione, sarà l'emissione di due distinti segnali fluorescenti le cui intensità saranno misurate confrontando i segnali emessi dal DNA campione e dal DNA di riferimento da uno specifico rilevatore.

IBRIDAZIONE GENOMICA COMPARATIVA SU ARRAY - (ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION - ACGH)

Rappresenta un'evoluzione del tradizionale CGH (vedi). In questo caso, l'analisi cromosomica comparativa viene effettuata mediante micro-array, per esaminare simultaneamente loci multipli e identificare la perdita o l'acquisto di tratti cromosomici di lunghezza variabile. Nel CGH, infatti, i DNA (test e *reference*), marcati con specifiche molecole fluorescenti, verranno ibridati su un microarray costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di un elevato numero di sonde che sono complementari a loci specifici di ciascun cromosoma, in modo da coprire l'intero genoma umano. Il risultato sarà in questo caso più preciso rispetto alla tecnica tradizionale e la lettura degli array avverrà mediante uno scanner apposito. L'immagine prodotta sarà poi esaminata con un software che effettuerà un'analisi comparativa tra le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA al fine di evidenziare variazioni del numero di copie. Attualmente, esistono diversi tipi di array con differente risoluzione in base alla tipologia di probe presenti sul vetrino; array ad alta risoluzione permettono di identificare CNV anche molto piccoli presenti nel genoma (circa 100 kilobasi).

IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION - CHIP)

È un metodo per rilevare interazioni proteina-DNA *in vivo*, che viene utilizzato in particolar modo per identificare i target genomici di specifiche proteine con attività regolatoria (fattori di trascrizione). In generale, la ChIP prevede il trattamento delle cellule con una sostanza in grado di favorire il legame tra DNA e proteine (come ad esempio la formaldeide), la frammentazione della cromatina e l'immunoprecipitazione della proteina di interesse mediante un anticorpo specifico. I frammenti di DNA immunoprecipitati rappresentano i siti di legame della proteina oggetto di studio nel genoma e, una volta separati dalle proteine (crosslinking), possono essere caratterizzati mediante sequenziamento con protocollo di ChIP-Seq (vedi).

ISOLAMENTO DI SINGOLE CELLULE (SINGLE CELL ISOLATION)

L'isolamento cellulare è un processo di separazione, delle singole cellule viventi, da un tessuto solido o da una sospensione cellulare. Alcuni tipi di cellule richiedono tecniche specifiche per essere separate in singole cellule. Le attuali tecniche per l'isolamento di singole cellule possono essere classificate in diversi gruppi: il primo si basa su proprietà fisiche come dimensioni, densità, cambiamenti elettrici e deformabilità, e utilizza metodi quali la centrifugazione a gradiente di densità, la filtrazione a membrana e le piattaforme di cattura basate su microchip; il secondo gruppo si basa su caratteristiche biologiche cellulari e comprende metodi di affinità (sfere, piastre, fibre) o tecniche di *sorting* cellulare basate sull'espressione di specifiche proteine di membrana; il terzo si basa sull'utilizzo di specifici anticorpi che ne permettono l'arricchimento dal campione biologico, la colorazione con altri anticorpi (ad esempio anticorpi anti-citocheratine e tracciante nucleare DAPI [4',6-diamidin-2-fenilindolo]) e la successiva visualizzazione digitalizzata su microscopi a fluorescenza. Tale approccio risulta oggi automatizzato su diverse piattaforme tecnologiche. A seguito dell'isolamento, è possibile eseguire ulteriori indagini molecolari sulle singole cellule isolate.

KNOCK-OUT GENICO (GENE KNOCK-OUT)

Tecnica utilizzata per silenziare uno specifico gene eliminandone, di conseguenza, la funzione. Generalmente, un knock-out genico si ottiene *in vitro* sostituendo il gene target con un suo derivato inattivo, mediante ricombinazione omologa. Questa modifica, integrata nel genoma, si trasmette stabilmente alle cellule figlie per cui le cellule modificate possono essere inoculate *in vivo* in modelli animali (generalmente topi)

per ottenere individui knock-out per il gene di interesse. In questo modo è possibile studiare le funzioni del gene target verificando gli effetti che la sua assenza determina sull'organismo.

METHYLATION SEQUENCING (METHYL-SEQ)

Metodo per studiare la metilazione del DNA sfruttando le tecnologie di sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi). In particolare, il DNA genomico è trattato con bisulfito in modo da convertire in uracile i residui di citosina non metilati. Successivamente si procede alla preparazione di una libreria di frammenti di DNA da sottoporre a sequenziamento di tipo NGS.

MICROARRAY

È un insieme di migliaia di oligonucleotidi (sonde o probe) di DNA o RNA adesi alla superficie di un supporto solido, in modo da poter analizzare simultaneamente la presenza di più geni all'interno di un campione. I microarray sfruttano una tecnica di ibridazione inversa in quanto le sonde sono fissate sul supporto solido e il campione da testare (target) è marcato con una molecola fluorescente.

I microarray possono essere utilizzati per analisi di genomica o di espressione genica. In particolare, per identificare i polimorfismi a singolo nucleotide o SNP (1) presenti in un campione di interesse vengono utilizzati gli SNP microarray. In questo caso, le sonde ibridate sulla superficie dell'array sono complementari agli SNP presenti nel genoma. Tale metodologia trova applicazione non solo in diagnostica molecolare, ma permette di effettuare anche studi di popolazione e/o di associazione, analisi di farmacogenomica o analisi di genetica forense. I microarray di espressione, invece, permettono di analizzare i livelli di espressione genica di un campione di interesse rispetto ad un controllo. In particolare, il confronto tra i profili di espressione genica di individui affetti e non affetti permette di individuare i geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi della malattia oggetto dello studio.

MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

È una metodica di multiplex PCR (vedi) che permette di rilevare la presenza di delezioni o duplicazioni (CNV) in uno o più geni di interesse. L'MLPA si basa sull'utilizzo di specifiche sonde (probe), ossia sonde oligonucleotidiche, disegnate in modo tale da essere complementari a due regioni contigue sul gene target e contenenti all'estremità 3' e 5' sequenze universali che fungono da primer. La peculiarità dell'MLPA, infatti, risiede nel fatto che le sonde ibridizzate al DNA genomico sono amplificate e quantizzate. In particolare, il DNA genomico viene denaturato e incubato con le sonde per favorirne l'ibridazione; una volta avvenuta l'ibridazione, la DNA ligasi unirà le due sonde contigue,

generando una sonda completa che sarà amplificata. I prodotti di PCR ottenuti saranno separati e quantificati mediante elettroforesi capillare, permettendo così la valutazione di eventuali delezioni o duplicazioni. Ai fini dell'analisi di campioni clinici, è necessario utilizzare, in ciascuna corsa effettuata, dei campioni di DNA normali contro i quali confrontare i campioni da analizzare.

MULTIPLEX-PCR

Evoluzione della tradizionale PCR (vedi) che permette l'amplificazione simultanea di diverse regioni genomiche target, attraverso l'utilizzo di diverse coppie di primer nella stessa reazione di amplificazione.

NORTHERN BLOT

Con questa tecnica l'RNA viene separato elettroforeticamente su gel e trasferito su una membrana alla quale viene aggiunta una sonda marcata che legherà, in maniera specifica, l'RNA d'interesse.

PIROSEQUENZIAMENTO (PYROSEQUENCING)

Tecnica di sequenziamento del DNA (vedi) che sfrutta la capacità della luciferasi di generare un segnale luminoso in presenza di ATP a seguito dell'incorporazione di un nucleotide in un filamento di DNA in elongazione, ad opera della DNA polimerasi. Infatti, durante la sintesi di un filamento di DNA, la DNA polimerasi incorporerà un nucleotide complementare al filamento di DNA template. Questa reazione determina il rilascio di una molecola di pirofosfato. Il pirofosfato viene utilizzato dall'enzima sulfurilasi per sintetizzare una molecola di ATP a partire da adenosinasolfosfato. L'ATP viene utilizzato dalla luciferasi per ossidare la luciferina ad ossiluciferina e generare un segnale luminoso che viene rilevato da una specifica camera. I 4 nucleotidi vengono aggiunti in maniera ciclica in modo che sia possibile dedurre ad ogni ciclo la corrispondenza tra nucleotide e segnale luminoso.

REAL-TIME PCR

La PCR Real time è un'evoluzione della tradizionale PCR (vedi). Si tratta di una metodica che consente la simultanea amplificazione e quantizzazione di un frammento di un acido nucleico (DNA o RNA) target, ovvero permette di stimare la quantità di amplificato durante la fase esponenziale di ogni ciclo della PCR, monitorandone la variazione. A tale scopo sono comunemente utilizzate delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA (ad esempio, il SYBR green) o specifiche sonde che emettono fluorescenza una volta ibridate con il DNA (ad esempio, le sonde TaqMan).

REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR)

Tecnica utilizzata per amplificare in maniera esponenziale regioni specifiche del DNA. Si basa sull'attività della DNA polimerasi e sull'utilizzo di primer specifici, disegnati in modo da essere complementari alle regioni fiancheggiatrici la sequenza di DNA d'interesse e che s'intende studiare. Pertanto, presupposto fondamentale della PCR, è che almeno le sequenze alle due estremità della regione di interesse devono essere note. La reazione di PCR prevede un'iniziale denaturazione del DNA genomico in modo da separare i due filamenti di DNA che serviranno da template per la DNA polimerasi. Successivamente, avviene l'*annealing*, ossia l'ibridazione dei primer alle loro sequenze complementari su ciascuno dei due filamenti di DNA denaturati, in modo da consentire alla polimerasi di sintetizzare i nuovi filamenti di DNA (elongazione). Questo processo viene ripetuto per un certo numero di cicli moltiplicando esponenzialmente la quantità di DNA target.

REVERSE DOT BLOT

È una metodica rapida per la ricerca simultanea di più mutazioni note. Si basa sull'immobilizzazione su una membrana di nitrocellulosa di più oligonucleotidi, complementari alle sequenze WT e mutate per diverse mutazioni causative di una patologia da testare. Il DNA genomico, amplificato utilizzando primer biotinilati, viene incubato con la membrana per favorirne l'ibridazione alle sonde. L'avvenuta reazione sarà visualizzata mediante l'aggiunta di streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina in grado di metabolizzare un substrato cromogeno con formazione di un precipitato viola/marrone in caso di avvenuta ibridazione.

RNA SEQUENCING (RNA-SEQ)

L'RNA sequencing (RNA-Seq) è un insieme di metodologie che, sfruttando le piattaforme di sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi), permette di studiare e quantizzare gli RNA (codificanti e non codificanti) presenti in un determinato campione biologico, in un dato momento o condizione.

I protocolli di RNA-Seq variano in base alla tecnica scelta e alla tipologia di RNA che si intende studiare, anche se mantengono tutti alcuni principi generali comuni. I campioni di RNA vengono estratti, quantizzati e sottoposti a verifica qualitativa per valutarne l'integrità. Segue, quindi, una fase di arricchimento/deplezione che permette di selezionare le popolazioni di RNA che si intende studiare. È possibile, ad esempio, arricchire gli RNA messaggeri sfruttando la coda di poli(A) o effettuare una deplezione degli RNA ribosomali. Successivamente, gli RNA isolati sono retrotrascritti in cDNA che viene utilizzato per ottenere una libreria di frammenti per le successive analisi di NGS (vedi).

SAGGIO IMMUNO ADSORBENTE LEGATO AD UN ENZIMA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY - ELISA)

La tecnica di saggio immuno assorbente legato a un enzima, o ELISA, è solitamente utilizzata in immunometria per rilevare e quantizzare in un determinato campione la presenza di una sostanza (antigene) utilizzando un anticorpo specifico legato ad un enzima. Negli anni sono stati sviluppati due metodi differenti: diretto e indiretto; nel primo viene rilevata la presenza di un antigene, nel secondo la presenza di un anticorpo contro un dato antigene.

SAGGIO OLA (OLIGONUCLEOTIDE LIGATION ASSAY)

Il saggio OLA è stato proposto per identificare mutazioni puntiformi note utilizzando sonde allele-specifiche. In particolare, si utilizzano due sonde allele-specifiche (una complementare alla sequenza WT e l'altra alla sequenza mutata, di diversa lunghezza) e un oligonucleotide comune complementare alla sequenza adiacente alla mutazione (marcato con un fluorocromo). Una volta denaturato il DNA, si avrà l'ibridazione solo della coppia perfettamente complementare che sarà unita ad opera della DNA ligasi. I prodotti ottenuti possono essere analizzati mediante elettroforesi capillare. La scelta di frammenti di lunghezza variabile e di differenti fluorocromi permette l'analisi di più mutazioni simultaneamente.

SCANNING DELL'ALANINA (ALANINE SCANNING)

È una tecnica che consiste nel modificare gli amminoacidi coinvolti nei legami ai residui di alanina allo scopo di determinare il contributo di specifici residui amminoacidici alla stabilità di una proteina di interesse o alla realizzazione di specifiche funzioni.

SEQUENZIAMENTO AD ELEVATA PRODUTTIVITÀ/DI NUOVA GENERAZIONE (HIGH THROUGHPUT/NEXT-GENERATION SEQUENCING - NGS)

Con il termine sequenziamento ad elevata produttività o di nuova generazione (NGS) si intende l'insieme delle tecnologie capaci di sequenziare in parallelo milioni di frammenti di DNA, senza che sia necessaria una conoscenza *a priori* del target che si intende sequenziare. In generale, queste metodologie prevedono tre passaggi principali e consecutivi: preparazione di una libreria, amplificazione della libreria e, infine sequenziamento della libreria amplificata. Al termine del sequenziamento i dati ottenuti vengono analizzati utilizzando specifiche strategie bioinformatiche. In breve, la preparazione della libreria è un insieme di procedure di biologia molecolare che

permettono di produrre una popolazione di frammenti, di dimensioni corrispondenti alla lunghezza delle sequenze che è possibile ottenere, e che presentano alle estremità dei primer universali che verranno utilizzati per le successive fasi di amplificazione e sequenziamento. Durante questo step, inoltre, è possibile inserire per ciascun campione una sequenza specifica che, fungendo da barcode molecolare, consente il sequenziamento in parallelo di numerose librerie, ciascuna identificata in maniera univoca. Il metodo di preparazione della libreria dipende dal target che si intende sequenziare (DNA, RNA) e dallo scopo del sequenziamento (vedi ad esempio RNA-Seq, Methyl-Seq). Successivamente, la libreria viene amplificata in maniera clonale. Infine, la libreria amplificata è sottoposta al sequenziamento. La chimica di sequenziamento varia a seconda del tipo di piattaforma NGS utilizzata. Ad esempio, alcuni strumenti utilizzano un sequenziamento per sintesi che impiega ddNTP marcati con fluorocromi differenti che fungono da terminatori reversibili di catena. In breve, una volta incorporato il dideozinucleotide (ddNTP), lo strumento legge il segnale fluorescente che permetterà di assegnare correttamente la base a quella posizione (*base calling*). La fluorescenza ed il blocco vengono, quindi, rimossi in modo da consentire il successivo ciclo di sequenziamento. Altre tecniche, invece, registrano la differenza di pH dovuta al rilascio di ioni idrogeno a seguito dell'incorporazione di un nuovo nucleotide in un filamento di DNA in elongazione. Dal momento che i 4 nucleotidi vengono erogati in ordine sequenziale fisso, è possibile ricostruire la sequenza, base per base, per ciascun ciclo di sequenziamento. Altre piattaforme, infine, sfruttano la chimica del pirosequenziamento (vedi). Al termine della fase di sequenziamento, i dati prodotti vengono analizzati con specifici sistemi bioinformatici che, in base al tipo di librerie e, quindi, alla finalità dell'esperimento, permettono di identificare variazioni di sequenza rispetto ad un genoma di riferimento, effettuare analisi di espressione differenziale, verificare i livelli di metilazione, e così via.

(Il ruolo di tecniche di sequenziamento genico ad elevata produttività per la diagnosi molecolare dei tumori ereditari della mammella. Biochim Clin 2018;42:285-9)

(Validazione preclinica della tecnologia "next generation sequencing" per l'identificazione di embrioni a mosaico durante l'analisi genetica preimpianto. Biochim Clin 2017;41:346-52)

SEQUENZIAMENTO DEL DNA (DNA SEQUENCING)

Tecnica che permette di stabilire l'ordine preciso dei nucleotidi presenti in una molecola di acido nucleico. Nel corso degli anni, sono state ideate diverse strategie per ottenere una sequenza nucleotidica.

Uno dei metodi più antichi, ad esempio, è quello ideato da Maxam e Gilbert (5), detto anche metodo chimico. Questa procedura prevedeva la marcatura del

DNA con un composto radioattivo. Il DNA marcato veniva, poi, denaturato e aliquotato in quattro reazioni, ciascuna delle quali era trattata con agenti chimici differenti in grado di provocare una rottura del DNA in corrispondenza di una specifica base. Da ciascuna reazione, quindi, si generava una miscela di frammenti di differenti dimensioni che potevano essere separati su gel di poliacrilammide per permettere la ricostruzione della sequenza.

Tuttavia, il metodo di Sanger (6), detto anche metodo dei terminatori di catena, ha di fatto soppiantato le altre chimiche di sequenziamento ed è stato per molti anni il metodo di elezione per il sequenziamento del DNA. Tale metodica si basa sull'impiego di nucleotidi modificati (ddNTP) che, avendo lo zucchero desossiribosio privo del gruppo ossidrilico in posizione 3', non permettono il legame del nucleotide successivo fungendo, di fatto, da terminatori della sintesi da parte della DNA polimerasi. Dal momento che l'incorporazione dei ddNTP avviene in maniera casuale, al termine della reazione di sequenziamento si ottiene una miscela di frammenti di lunghezza differente che possono essere separati per ricostruire la sequenza del DNA target. In origine, i ddNTP venivano marcati con una sostanza radioattiva e il sequenziamento avveniva in quattro reazioni, ciascuna delle quali conteneva un unico ddNTP marcato. I frammenti venivano poi analizzati dopo separazione mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Oggi, sfruttando una miscela di ddNTP ciascuno marcato con una sostanza fluorescente specifica, è possibile effettuare un'unica reazione e l'analisi dei frammenti avviene mediante elettroforesi capillare in sistemi automatizzati.

SEQUENZIAMENTO DELL'ESOMA (EXOME SEQUENCING)

L'esoma è l'insieme di tutte le porzioni del genoma che codificano proteine. Pur rappresentando una quota vicina all'1,5% dell'intero genoma, è in queste regioni che avviene oltre l'85% delle mutazioni oggi note come clinicamente rilevanti.

Pertanto, per sequenziamento dell'esoma si intende una serie di procedure che hanno come obiettivo il sequenziamento solo delle regioni trascritte e codificanti del genoma umano (esoni); per quest'analisi è prevista la preparazione di una libreria di frammenti di DNA genomico accoppiata all'arricchimento selettivo delle regioni di interesse mediante ibridazione (cattura) con specifiche probe di arricchimento; la fase successiva prevede il sequenziamento delle stesse librerie mediante piattaforme NGS. Attualmente, è possibile fare una differenza fra il *Whole Exome Sequencing* (WES), che comprende l'analisi di tutti i geni del genoma umano ad oggi annotati, e il *Clinical Exome Sequencing* (CES), che prevede l'analisi di tutti i geni fino ad ora noti per essere associati all'insorgenza di specifiche patologie.

SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA (WHOLE GENOME SEQUENCING)

Il sequenziamento dell'intero genoma è una tecnica sperimentale capace di analizzare l'intero genoma di un organismo di interesse sfruttando le metodologie NGS. Tale approccio viene anche definito metodo *shotgun*: nello specifico, il DNA genomico viene prima frammentato, poi viene preparata una libreria di frammenti e, infine, si procede al sequenziamento NGS.

SEQUENZIAMENTO DI PICCOLI RNA (SMALL RNA SEQUENCING)

È un tipo di RNA-Seq (vedi) che, sfruttando le piattaforme di sequenziamento ad elevata produttività o NGS (vedi), permette di studiare e quantizzare gli RNA non codificanti di piccole dimensioni presenti in un determinato campione biologico, in un dato momento o condizione.

I protocolli di small RNA-Seq prevedono, durante la fase di preparazione della libreria, la selezione delle popolazioni di RNA di interesse, in base alle dimensioni, mediante estrazione da gel di poliacrilammide. Successivamente, gli RNA isolati vengono retrotrascritti in modo da ottenere una libreria di frammenti per il sequenziamento NGS.

SEQUENZIAMENTO DI SINGOLE CELLULE (SINGLE CELL SEQUENCING)

Tecnica che permette di sequenziare il DNA contenuto in una singola cellula, precedentemente e opportunamente isolata. Questa tecnica è basata sull'impiego di tecniche di sequenziamento NGS (vedi) e permette di evidenziare eventuali differenze tra le varie cellule analizzate permettendo la comprensione delle funzioni di una singola cellula nel contesto del suo microambiente.

Il sequenziamento di una singola cellula prevede: l'isolamento della cellula, l'amplificazione dell'intero genoma (WGA), la preparazione delle librerie e infine il sequenziamento tramite piattaforme NGS.

(Whole genome amplification on single cell. BiochimClin 2016;40:293-301)

SEQUENZIAMENTO DI TERZA GENERAZIONE (THIRD GENERATION SEQUENCING)

Con questo termine si intende una serie di tecniche che rappresentano un'evoluzione delle metodiche NGS. Tali tecnologie, permettendo il sequenziamento di singole molecole, sono in grado di evitare la fase di amplificazione clonale delle librerie. In questo modo, non solo si riducono i costi e i tempi di analisi, ma si elimina anche una fonte di errore, legata alla stessa fase di amplificazione. Inoltre, l'ulteriore vantaggio è rappresentato dalla possibilità di ottenere sequenze

estremamente lunghe (alcune migliaia di basi in media). Esempi di tali tecnologie sono i sistemi basati sull'impiego di nanopori (*nanopore sequencing*), i sistemi di sequenziamento di singola molecola di DNA (*single molecule DNA sequencing*, SMDS) o di sequenziamento diretto di RNA (*direct RNA sequencing*, DRS), e il sistema di sequenziamento di singole molecole in real time (*single molecule real time sequencing*, SMRT-Seq).

SOUTHERN BLOT

Mediante questa tecnica è possibile identificare, utilizzando una sonda specifica, un frammento di DNA d'interesse.

In dettaglio, il DNA genomico viene digerito grazie a delle specifiche endonucleasi e i frammenti ottenuti vengono separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio o di poliacrilammide. Il gel viene, quindi, immerso in una soluzione alcalina per favorire la denaturazione del DNA. A questo punto, viene realizzato il "blotting": il gel viene coperto da un foglio di nitrocellulosa su cui viene posta una pila di fogli assorbenti. Per capillarità il DNA tenderà a depositarsi sul foglio di nitrocellulosa. Successivamente, il foglio di nitrocellulosa con il DNA adsorbito viene immerso in una soluzione contenente una sonda specifica che ibridizza con sequenze di DNA complementari presenti sul foglio; grazie ad una lastra autoradiografica è possibile, infine, identificare le sonde legate al DNA genomico d'interesse.

SPETTOFOTOMETRIA (SPECTROPHOTOMETRY)

È una tecnica analitica, capace di fornire informazioni qualitative e quantitative sul campione in esame grazie allo spettro di assorbimento della luce UV. Questa tecnica viene frequentemente utilizzata per quantizzare in modo preciso il DNA isolato.

Il DNA presenta un picco di assorbimento a 260 nm di lunghezza d'onda. Quando un raggio di luce a tale lunghezza d'onda colpisce la soluzione di DNA, una parte di energia viene assorbita dalle basi azotate del DNA, il raggio in uscita dalla cuvetta sarà di minore intensità. A questa lunghezza d'onda viene misurato il valore di assorbimento utilizzato per calcolare la concentrazione del DNA. Qualora dovessero esserci delle contaminazioni di proteine o fenoli si otterrà uno spettro deformato con un picco anche a 280 nm.

SPETTOMETRIA DI MASSA (MASS SPECTROMETRY)

Tecnica analitica per l'identificazione di sostanze presenti in miscele complesse. La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione delle molecole presenti in un campione da analizzare, generalmente utilizzando un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così

ionizzate vengono separate in funzione del loro rapporto massa/carica, generalmente tramite campi magnetici. Ne risulta uno spettro di massa, ossia un diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica; tale spettro è tipico di ogni composto ed è direttamente correlato alla sua struttura chimica e alle condizioni di ionizzazione.

(Determinazione del perampanel plasmatico: confronto e cross-validazione tra due metodi in cromatografia liquida ad elevate prestazioni con rivelatore spettrofluorimetrico e con rivelatore a spettrometria di massa. Biochim Clin 2018;42:217-24)

(Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali. Biochim Clin 2018;42:51-61)

(Analisi dei profili della troponina T cardiaca ottenuti con spettrometria di massa MALDI nel siero di soggetti sani e malati. Biochim Clin 2017;41:154-60.)

(Sviluppo di un metodo in cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem per valutare la permeabilità intestinale nella pratica clinica. Biochim Clin 2017;41:60-3)

(Validazione del dosaggio delle metanefrine plasmatiche mediante cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem. Biochim Clin 2017;41:50-9)

TRASFEZIONE (TRANSFECTION)

Meccanismo d'introduzione di un DNA esogeno in cellule eucariotiche. La trasfezione può essere transiente o stabile, a seconda che il DNA trasfettato venga mantenuto nel citoplasma per un periodo limitato di tempo (come 2 o 3 giorni) o integrato nel genoma cellulare.

TRASFORMAZIONE (TRANSFORMATION)

Processo mediante il quale il materiale genetico contenuto in una singola cellula viene alterato dall'incorporazione di DNA esogeno nel suo genoma.

WESTERN BLOT

È una tecnica analitica capace di identificare una proteina di interesse in una miscela complessa, attraverso l'utilizzo di specifici anticorpi. Per il Western blot è previsto l'utilizzo di una elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodiododecilsolfato (SDS-PAGE) per la separazione delle proteine in base alla loro massa molecolare; le proteine sono successivamente trasferite su un supporto, solitamente di nitrocellulosa, dove sono identificate mediante l'utilizzo di anticorpi specifici; il legame antigene-anticorpo viene rilevato mediante reazione colorimetrica o chemiluminescenza. Come risultato è possibile identificare e quantificare una data proteina contenuta nel campione in esame.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

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;43:90-105.
2. Watson JD, Baker TA, Bell SP, et al. *Biologia molecolare del gene*. Bologna: Zanichelli, 2015, VI edizione.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biologia molecolare della cellula*. Bologna: Zanichelli, 2016, VI edizione.
4. Cariati F, Borrillo F, Shankar V, et al. Dissecting intratumor heterogeneity by the analysis of copy number variations in single cells: the neuroblastoma case study. *Int J Mol Sci* 2019 doi: 10.3390/ijms20040893
5. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:560-4.
6. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5463-7.

APPENDICE

Indice analitico dei termini riportati nel glossario elencati in ordine alfabetico in base alla lingua italiana. e inglese. Si riporta anche la corrispondente traduzione.

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Agglutinazione	Agglutination	Agglutination	Agglutinazione
Amplificazione allele specifica	Amplification refractory mutation system	Alanine scanning	Scanning dell'alanina
Amplificazione del DNA	DNA amplification	Allele specific	ASO testing
Amplificazione dell'intero genoma	Whole genome amplification	Oligonucleotide	
-	Amplified fragment length polymorphism	Amplification refractory mutation system	Amplificazione allele specifica
ASO testing	Allele specific oligonucleotide	Amplified fragment length polymorphism	-
-	Assay for transposase accessible chromatin sequencing	Array comparative genomic hybridization	Ibridazione genomica comparativa su array
Bandeggio dei cromosomi	Chromosome banding	Assay for transposase accessible chromatin sequencing	-
-	BEAMing PCR	BEAMing PCR	-
-	Blotting	Blotting	-
Cariotipo	Karyotype	Capillary electrophoresis	Elettroforesi capillare
-	Chromatin immunoprecipitation sequencing	Cell culture	Colture cellulari
Citometria a flusso	Flow cytometry	Chromatin immunoprecipitation sequencing	-
Clonaggio	Cloning	Chromatin immunoprecipitation	Immunoprecipitazione della cromatina
Clonazione	Clonation	Chromatography	Cromatografia
Colture cellulari	Cell culture	Chromosome banding	Bandeggio dei cromosomi
Complementazione in vitro	In vitro complementation	Clonation	Clonazione
-	CRISPR/Cas9	Cloning	Clonaggio
Cristallografia a raggi X	X-ray crystallography	Comparative genomic hybridization	Ibridazione genomica comparativa
Cromatografia	Chromatography	CRISPR/Cas9	
-	Dep-array	Denaturing gradient gel electrophoresis	Elettroforesi su gel con gradiente di denaturazione
-	Digital PCR	Dep-array	-
-	DNA transfer	Digital PCR	-
-	DNASE I hypersensitive sites sequencing	DNA amplification	Amplificazione del DNA
Editing del genoma umano	Genome editing	DNA fingerprinting	Fingerprinting del DNA
Elettroforesi	Electrophoresis	DNASE I hypersensitive sites sequencing	-
Elettroforesi capillare	Capillary electrophoresis	DNA sequencing	Sequenziamento del DNA
Elettroforesi su gel	Gel electrophoresis	DNA transfer	-
Elettroforesi su gel con gradiente di denaturazione	Denaturing gradient gel electrophoresis	Electrophoresis	Elettroforesi
Estrazione di acidi nucleici	Nucleic acid extraction	Enzyme-linked immunosorbent assay	Saggio immuno-adsorbente legato ad un enzima
Fingerprinting del DNA	DNA fingerprinting	Exome sequencing	Sequenziamento dell'esoma
-	Fluorescence resonance energy transfer	Flow cytometry	Citometria a flusso
-	Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements sequencing	Fluorescent in situ hybridization	Ibridazione fluorescente in situ
-	High resolution melting analysis	Fluorescence resonance energy transfer	-
Ibridazione fluorescente in situ	Fluorescent in situ hybridization	Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements sequencing	-
Ibridazione genomica comparativa	Comparative genomic hybridization	Gel electrophoresis	Elettroforesi su gel
Ibridazione genomica comparativa su array	Array comparative genomic hybridization	Gene knock-out	Knock-out genico
Immunoprecipitazione della cromatina	Chromatin immunoprecipitation	Genome editing	Editing del genoma umano
Isolamento di singole cellule	Single cell isolation	High resolution melting analysis	-
Knock-out genico	Gene knock-out	High throughput/Next-generation sequencing	Sequenziamento ad elevata produttività/ di nuova generazione
-	Methylation sequencing	In vitro complementation	Complementazione in vitro
-	Microarray	Karyotype	Cariotipo
-	Multiplex ligation-dependent probe amplification	Mass spectrometry	Spettrometria di massa
-	Multiplex-PCR	Methylation sequencing	-
-	Northern Blot	Microarray	-

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Pirosequenziamento	Pyrosequencing	Multiplex ligation-dependent probe amplification	-
-	Real time PCR	Multiplex-PCR	-
Reazione a catena della polimerasi	Polymerase chain reaction	Northern blot	-
-	Reverse dot blot	Nucleic acid extraction	Estrazione di acidi nucleici
-	RNA sequencing	Oligonucleotide ligation assay	Saggio OLA
Saggio immuno-adsorbente legato ad un enzima	Enzyme-linked immunosorbent assay	Polymerase chain reaction	Reazione a catena della polimerasi
Saggio OLA	Oligonucleotide ligation assay	Pyrosequencing	Pirosequenziamento
Scanning dell'alanina	Alanine scanning	Real time PCR	-
Sequenziamento ad elevata produttività/ di nuova generazione	High throughput/Next-generation sequencing	Reverse dot blot	-
Sequenziamento del DNA	DNA sequencing	RNA sequencing	-
Sequenziamento dell'esoma	Exome sequencing	Single cell isolation	Isolamento di singole cellule
Sequenziamento dell'intero genoma	Whole genome sequencing	Single cell sequencing	Sequenziamento di singole cellule
Sequenziamento di piccoli RNA	Small RNA sequencing	Small RNA sequencing	Sequenziamento di piccoli RNA
Sequenziamento di singole cellule	Single cell sequencing	Southern blot	-
Sequenziamento di terza generazione	Third generation sequencing	Spectrophotometry	Spettrofotometria
-	Southern blot	Third generation sequencing	Sequenziamento di terza generazione
Spettrofotometria	Spectrophotometry	Transfection	Trasfezione
Spettrometria di massa	Mass spectrometry	Transformation	Trasformazione
Trasfezione	Transfection	Western blot	-
Trasformazione	Transformation	Whole genome amplification	Amplificazione dell'intero genoma
-	Western blot	Whole genome sequencing	Sequenziamento dell'intero genoma
		X-ray crystallography	Cristallografia a raggi X

Documento di consenso Gruppo di Studio di Farmacotossicologia Clinica e Doping SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI). Modalità per lo svolgimento di indagini di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso

Donata Favretto¹, Simona Pichini², Paolo Bucchioni³, Roberta Pacifici²

¹Laboratorio Tossicologia Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova

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

³ASL 5 Liguria - Laboratorio Tossicologia Levante Ligure, Azienda Sanitaria Locale 5 Liguria

ABSTRACT

Consensus document of the Study Group on Clinical Pharmacotoxicology and Doping of Italian Society of Clinical Biochemistry and Italian Forensic Toxicologists Group (GTFI) – for laboratories involved in the determination of substances of abuse. The greatest workload for the laboratories performing pharmacotoxicological tests remains the routine activity for detection and measurement, in different biological matrices, of psychotropic substances such as opiates, cocaine, cannabinoids, amphetamines, methadone, buprenorphine and ethyl alcohol. In addition to the investigations requested for clinical reasons, the requests to the pharmacotoxicological laboratories may also include medico-legal investigations, whose variety and complexity contributed to the adoption of personalized and extremely diverse operating modalities implemented in the Italian laboratories. The purpose of this document is to provide the Laboratories of the National Health Service in Italy that are planning to carry out or that already perform determination of drugs of abuse for medico-legal purposes, with recommendations at national level that take into account the “good laboratory practices” recognized at the international level in order to perform accurate and precise analytical tests so that they can meet the requirements necessary to provide a high quality and legally unassailable service.

INTRODUZIONE

Sebbene la diffusione di innumerevoli nuove molecole psicoattive rappresenti un'importante e crescente sfida per i laboratori che eseguono accertamenti tossicologici, il maggior carico di lavoro per queste strutture rimane l'attività quotidiana di ricerca e determinazione, in differenti matrici biologiche, di molecole ben conosciute sia da un punto di vista chimico-analitico che tossicologico, come oppiacei, cocaina, cannabinoidi, amfetamine, metadone, buprenorfina e alcol etilico.

Le richieste che giungono ai laboratori possono riguardare, oltre ai quesiti clinici, anche le procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza e di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori che svolgono mansioni che comportano particolari rischi per la

sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi, le determinazioni analitiche volte ad accertare violazioni del Nuovo Codice della Strada e degli articoli 589-bis e 590 del Codice Penale, gli accertamenti per la revisione dei requisiti per la patente di guida, gli accertamenti di morte con criteri cerebrali, o altre istanze che possono arrivare da Prefettura, Tribunale, Tribunale dei Minori, Procura o altri organismi pubblici.

Si tratta quindi di accertamenti a finalità medico-legale, la cui varietà di tipologie, ha contribuito all'adozione da parte del singolo laboratorio di modalità operative personalizzate ed estremamente disomogenee fra laboratori (1).

Lo scopo di questo documento è quello di fornire ai laboratori appartenenti a strutture del Servizio Sanitario Nazionale che progettano di effettuare o che già effettuano attività accertative con finalità medico-legale, raccomandazioni condivise a livello nazionale che

Corrispondenza a: Simona Pichini, Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, V.Le Regina Elena 299, 00161 Roma, Tel +39 06 49906545.

Ricevuto: 29.11.2019

Accettato: 03.04.2019

Publicato on-line: 17.04.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.037

tengano conto delle buone pratiche di laboratorio riconosciute a livello internazionale per effettuare accertamenti analitici precisi e accurati in modo che essi possano far propri i requisiti necessari ad erogare un servizio di elevata qualità.

Con il presente documento si intende:

- riassumere in pochi punti essenziali i fondamenti di un contesto operativo di qualità per i laboratori che eseguono analisi per le sostanze d'abuso a fini sia clinici che medico-legali;
- richiamare raccomandazioni già condivise a livello nazionale e già espresse nelle Linee Guida del Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI) e dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che rappresentano comunque i documenti di riferimento;
- assicurare che le procedure operative messe in atto dal laboratorio producano un risultato accurato e legalmente difendibile;
- definire, per tutti i laboratori che eseguono questa tipologia di esami, criteri comuni di assicurazione e controllo della qualità accreditabili da un organismo esterno.

I PUNTI DEL DOCUMENTO DI CONSENSO

Campionamento

Il prelievo e la raccolta dei campioni biologici generalmente avvengono in punti lontano dal laboratorio ove saranno curate anche le modalità di consenso.

Devono essere adottati adeguati protocolli di prelievo e raccolta dei campioni biologici che evitino la sostituzione o alterazione/adulterazione dei campioni stessi, e una catena di custodia che identifichi univocamente e accompagni i campioni, documentando dove si trovano e a chi sono affidati presso il punto di prelievo/raccolta, durante il trasferimento al laboratorio, per tutto il tempo del processo analitico e dopo la refertazione (conservazione a fini di controanalisi) (2-6).

È indispensabile che l'incaricato dell'accettazione del campione in laboratorio consideri con attenzione, all'arrivo dello stesso, se sia presente o meno la catena di custodia, se essa sia stata correttamente compilata, se i campioni siano integri e correttamente conservati. In caso contrario, dovrà essere segnalata una non-conformità che dovrà essere risolta prima di procedere all'analisi e ad emettere un referto.

È indispensabile sempre prelevare più aliquote del campione (ad esempio due o più provette di sangue) o la suddivisione in più aliquote di un unico prelievo/raccolta (ad esempio due o più provette di urina, suddivisione di ciocche di capelli e così via) (3).

Determinazione analitica

La determinazione di sostanze d'abuso e/o metaboliti nelle differenti matrici biologiche con finalità medico-legali richiede che siano eseguite per ogni campione e

ogni richiesta almeno due diverse procedure analitiche, su due diverse aliquote dello stesso campione. La prima procedura può avere carattere di screening (cosiddetto primo livello) mentre la seconda ha caratteristiche di conferma (cosiddetto secondo livello) (3-5).

Non può avere validità forense (medico-legale) un risultato positivo ottenuto con un'unica prova di screening (2). È necessario che il risultato sia verificato da analisi di conferma specifica e basata su principi chimico-fisici diversi dalla precedente.

I laboratori che effettuano analisi per la determinazione di sostanze d'abuso e/o metaboliti nelle differenti matrici biologiche con finalità medico-legali, devono essere dotati di strumentazione per analisi di screening e/o strumentazione per analisi di conferma che impieghino procedure separative cromatografiche e accoppiate alla spettrometria di massa come sistema di rivelazione. Tali strumentazioni possono essere utilizzate anche per analisi di screening, mentre sono necessarie e non sostituibili per le analisi di conferma (2-6).

La determinazione dell'alcolemia su sangue intero (e non su siero o plasma, che sono invece matrici adatte a soddisfare un quesito clinico-diagnostico) può essere eseguita sia in gas cromatografia in spazio di testa con rivelatore a ionizzazione di fiamma che in gas cromatografia in spazio di testa con rivelatore spettrometrico di massa, prevedendo sempre l'analisi di due o più aliquote di sangue di controllo, precedute dalla valutazione analitica di un bianco campione (2).

Il personale operante nel laboratorio deve essere adeguatamente formato all'utilizzo di suddetta strumentazione e all'interpretazione analitica del risultato. Tutte le procedure di analisi (i metodi analitici) devono essere adeguatamente validate in laboratorio prima del loro utilizzo, seguendo i dettami di linee guida internazionali (2).

È necessario avere implementato un sistema di gestione in qualità (norme ISO) del processo analitico che preveda sia l'uso di controlli di qualità interni, che la partecipazione a programmi di controlli di qualità esterni (*proficiency testing*) (2-5).

Quesito

È indispensabile che il dirigente responsabile del laboratorio consideri con attenzione il quesito relativo all'accertamento richiesto e identifichi la finalità clinica/medico-legale, anche ai sensi della vigente normativa di Legge (ad esempio articoli 186 e 187 del Nuovo Codice della Strada) (7).

È fondamentale valutare se la matrice biologica inviata (urina, sangue, siero, plasma, formazioni pilifere, saliva o altro) sia idonea a soddisfare il quesito suddetto e aprire una non-conformità nel caso l'indagine non possa essere svolta per non idoneità della matrice (ad esempio richiesta ex articolo 186 Nuovo Codice della Strada e prelievo di siero) (7).

Conservazione dei campioni

In assenza di disposizioni di Legge, eseguite le analisi, è necessario conservare i campioni richiesti dall'Autorità Giudiziaria, sia negativi che positivi, per un periodo non inferiore ai 12 mesi. Di tale periodo va dato atto agli aventi diritto (indagato, autorità giudiziaria), dichiarandolo nel referto.

Per i campioni derivanti da quesiti medico-legali di altra natura (Idoneità alla guida, Decreto Legge 81/2008 o altro, il cui richiedente sia diverso dall'Autorità Giudiziaria), sarà sufficiente la conservazione dei soli campioni positivi per un periodo che il laboratorio giudicherà opportuno rispetto alle esigenze del titolare della richiesta (2).

È consigliabile altresì conservare i campioni positivi per sostanze d'abuso giunti al laboratorio con quesito clinico, per almeno 6 mesi, perché potrebbero comunque essere oggetto di sequestro giudiziale da parte della autorità giudiziaria, anche se rimane valido il concetto della non correttezza dell'utilizzo a fini forensi di un liquido biologico già analizzato e manipolato (2).

Risulta indispensabile conservare i campioni alla temperatura di -18/-22°C (ad eccezione per il campione che venga analizzato entro 24 ore dal prelievo che può essere conservato a +2/+8°C). I campioni di matrice cheratinica devono essere invece conservati a temperatura ambiente) (2-6).

Refertazione

I test di screening forniscono risultati qualitativi: negativi o presuntivamente positivi.

I campioni risultanti allo screening presuntivamente positivi (ovvero non negativi) devono essere sempre sottoposti ad un più specifico esame di conferma se la tipologia di richiesta ha una finalità medico-legale oppure ai sensi di Legge (Decreto Legge 81/2008 e Conferenza Stato-Regioni e Unificata).

Se è necessario refertare i risultati di un esame di screening ottenuto con tecniche immunochimiche o enzimatiche (ad esempio nel caso di quesito clinico oppure di esame iniziale nel controllo dei lavoratori), va indicato il solo valore qualitativo (2).

Ove esistenti dei valori-soglia di Legge (Decreto Legge 81/2008 e Conferenza Stato-Regioni e Unificata), il valore qualitativo positivo/negativo va indicato rispetto al valore soglia di Legge.

Negli altri casi, è necessario riferire il valore qualitativo positivo/negativo ai valori soglia indicati e validati dal produttore del prodotto commerciale utilizzato come screening in laboratorio. Tali valori soglia vanno comunque indicati nel referto (2-6).

Se il metodo di screening non utilizza una tecnica immunochimica o enzimatica (ad esempio una tecnica separativa cromatografica con idoneo rivelatore), il laboratorio avrà cura di validare il proprio metodo identificando anche in tal caso adeguati limiti di rilevazione che permettano di ridurre al minimo i falsi

negativi, assicurando nel contempo la possibilità di conferma dei presunti positivi. Il limite di rilevazione del metodo dovrà essere coerente con le conoscenze scientifiche farmaco-tossicologiche di merito e adeguato alle caratteristiche del metodo di conferma utilizzato.

Se esistono valori soglia di Legge per le analisi di conferma, discriminanti un campione negativo da un campione positivo rispetto alla concentrazione di una sostanza (Decreto Legge 81/2008 e Conferenza Stato-Regioni e Unificata), nella refertazione andrà indicato sia il superamento o meno di tale valore soglia (positivo o negativo) che il corrispondente dato quantitativo per i soli risultati positivi (2).

In assenza di valori soglia interpretativi di legge per le analisi di conferma, devono essere utilizzati quelli stabiliti da Linee Guida se esistenti (ad esempio le Linee Guida GTFI e ISS) o da gruppi di esperti nazionali e internazionali e comunque dovranno essere valori condivisi dalla comunità scientifica (6).

È consigliabile riportare nel referto finale di un campione positivo confermato insieme al valore numerico quantitativo, i dati relativi all'incertezza analitica del metodo applicato, come calcolata durante il protocollo di validazione.

Non è appropriato refertare "tracce" di sostanze non quantificate (2).

Conservazione dei referti

I referti con la documentazione relativa alla catena di custodia devono essere conservati per un tempo non inferiore ai 5 anni, salvo i casi previsti di conservazione illimitata (ad esempio nel caso di una cartella clinica) (2).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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. http://www.gtfi.it/wpcontent/uploads/2017/06/LG_biologic_o_revisione_2017_29_05.pdf (ultimo accesso: marzo 2019).
3. Pichini S, Pacifici R. Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Saliva_xw_eb.pdf (ultimo accesso: marzo 2019).
4. Pichini S, Pacifici R. Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Capelli_xw_eb.pdf (ultimo accesso: marzo 2019).
5. Pichini S, Pacifici R. Linee Guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera http://old.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Urine_xwe_b.pdf(ultimo accesso: marzo 2019).

6. Pichini S, Bucchioni P, Pellegrini M, et al. Procedure operative per la determinazione delle sostanze d'abuso su sangue <https://iss-ofad.azurewebsites.net/wp-content/uploads/2018/03/procedure-operative-sangue.pdf> (ultimo accesso: marzo 2019).
7. 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.

Ringraziamento

Il Direttore e l'Editore della rivista ringraziano i componenti del Comitato Editoriale e tutti i Colleghi che hanno collaborato per la revisione dei manoscritti inviati a Biochimica Clinica nel corso del 2019.

Acknowledgement

The Editor-in-Chief and the Publisher would like to thank the members of the Editorial Board and all the colleagues for their kind assistance in reviewing articles submitted to Biochimica Clinica in 2019.

*Fiamma Balboni, Firenze
Chiara Bellia, Palermo
Gaetano Bernardi, Milano
Marco Besozzi, Milano
Graziella Bonetti, Brescia
Sabrina Buoro, Bergamo
Anna Caldini, Firenze
Ettore Capoluongo, Roma
Ferruccio Ceriotti, Milano
Giovanni Cigliana, Roma
Aldo Clerico, Pisa
Giorgio Da Rin, Genova
Valeria D'Argenio, Napoli
Antonio Fortunato, Ascoli Piceno
Massimo Franchini, Mantova
Davide Giavarina, Vicenza
Bruna Lo Sasso, Palermo
Giampaolo Merlini, Pavia
Martina Montagnana, Verona
Benedetto Morelli, Castenedolo (BS)
Andrea Mosca, Milano
Tiziana Notari, Salerno
Cosimo Ottomano, Monza
Giovanni Palladini, Pavia
Paola Pauri, Jesi (AN)
Paola Pezzati, Firenze
Simona Pichini, Roma
Alessandro Terreni, Firenze
Sophie Testa, Cremona
Rossella Tomaiuolo, Napoli
Tommaso Trenti, Modena
Matteo Vidali, Novara
Carlo Zambon, Padova
Martina Zaninotto, Padova
Luisa Zanolla, Verona*

Volume 43, 2019

Indice dei contenuti

Index of contents

EDITORIALI - EDITORIALS

L'avanzamento della biologia molecolare clinica nella diagnostica di laboratoriorichiede importanti attività di armonizzazione 11

Nota all'Editoriale sul Documento della Organizzazione Mondiale della Sanità 13

Il consolidamento dei Servizi di Medicina di Laboratorio 123

La determinazione dell'insulina richiede particolari attenzioni 255

Le gammopatie monoclonali: una sfida continua per la Medicina di Laboratorio 355

RASSEGNE - REVIEWS

Il ruolo della metabolomica nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie metaboliche ereditarie 14

La biologia molecolare clinica nella valutazione e prevenzione del rischio cardiologico nell'attività sportiva e nell'attività motoria intensa 24

La tele-ematologia nel consolidamento dei laboratori clinici 125

La spettrometria di massa nella diagnosi e nel monitoraggio delle gammopatie monoclonali 256

La diagnostica di laboratorio nella sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi 264

Identificazione di geni di normalizzazione per studi trascrizionali con Polymerase Chain Reaction 357

Gammopatie monoclonali: quadri clinici principali e ruolo del laboratorio 366

CONTRIBUTI SCIENTIFICI - SCIENTIFIC PAPERS

La riorganizzazione del settore dedicato alla diagnostica proteica: un esempio virtuoso fondato su criteri di Evidence Based Laboratory Medicine e di sostenibilità economica 44

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 52

Importanza dell'utilizzo di Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist nel disegno sperimentale di studi di variabilità biologica. Valutazione a 59

INDICE

confronto di due pubblicazioni sulla variabilità biologica della proteina S100-β e dell'enzima neuronale specifico		Enterobacteriaceae from culture colonies	
Garantire la comparabilità dei risultati nel rispetto dei requisiti di qualità e delle esigenze organizzative: l'esempio di una procedura operativa	135	Comparative study of galectin-3, brain natriuretic peptide, cysteine C and high sensitivity troponin determinations in the diagnosis of heart failure in elderly Italian males	399
Analisi di laboratorio in un punto di primo intervento: l'esperienza di sei anni di Point-of-Care Testing	143	Studio preliminare del microbiota intestinale, cutaneo e della mucosa orale in pazienti affetti da Pemfigo volgare e Pemfigoide bolloso	406
La fase pre-analitica dei campioni provenienti dal Pronto Soccorso: impatto della introduzione di un impianto di posta pneumatica nel miglioramento del tempo di risposta	150		
OPINIONI - OPINIONS			
URIT 11F dipstick for proteinuria testing: comparison with quantitative protein assay and evaluation of the diagnostic accuracy for proteinuria detection in a outpatient population	269	La catena di custodia: problematiche generali ed esperienza nella Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 Centro	67
L'interferenza dell'emolisi sulla misura dell'insulina	273	Laboratorio clinico: non sempre più grande è migliore	156
Telomere shortening and PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer mucosae	278	Gli esami urgenti nel consolidamento dei laboratori: analisi decentrate, Point-of-Care and Near-Patient testing	162
Procalcitonin levels in Sjögren syndrome	284	La valutazione delle prestazioni analitiche dei laboratori mediante programmi di valutazione esterna di qualità: una analisi multifattoriale	168
Galectin-3 and Lp(a) plasma concentrations and advanced carotid atherosclerotic plaques: correlation with plaque presence and features	289	Il contributo dell'automazione alla qualità del consolidamento nei Servizi di Medicina di Laboratorio	173
Variabilità biologica dei parametri dell'esame emocromocitometrico in soggetti sani	384	La metilazione del DNA nella diagnostica: stato dell'arte e prospettive	413
Evaluation of a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of carbapenemase-producing	394	Gammopatie monoclonali di significato clinico	421

DOCUMENTI

		Ridurre l'inappropriatezza in medicina di laboratorio: come, quando e perchè	305
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	76	La variabilità preanalitica in coagulazione	313
Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali	90	Interferenza da biotina negli immunodosaggi	327
Siero o plasma? Un quesito non nuovo che attende risposte nuove	178	Raccomandazioni per l'implementazione del Test genetico BRCA1/2 nelle pazienti con carcinoma ovarico: dall'analisi sul tessuto tumorale a quella su DNA germinale. A cura di: Gruppo di Lavoro SIBioC Biologia Molecolare, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica-Divisione Italiana della International Accademy of Pathology (SIAPEC-IAP).	332
Medicina di Laboratorio e Medicina d'Urgenza: il connubio continua	296	Oncologia di precisione: la terminologia è importante. A cura del Gruppo di Lavoro Biologia Molecolare di SIBioC, Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica- (SIAPEC), Società Italiana di Farmacologia (SIF).	339
La Medicina di Laboratorio: gli specialisti di domani	424		
Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare	435		

DOCUMENTI SIBioC - SIBioC DOCUMENTS

Raccomandazioni per l'esecuzione di indagini molecolari su biopsia liquida in oncologia	106	Documento di consenso Gruppo di Studio di Farmacotossicologia Clinica e Doping SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi (GTFI). Modalità per lo svolgimento di indagini di laboratorio per la determinazione delle sostanze d'abuso	449
Raccomandazioni FISMeLab per il trasporto del materiale biologico	187		
Raccomandazione congiunta EFLM-COLABIOCLI per il prelievo di sangue venoso	200		
Protocollo operativo per la verifica della comparabilità dei risultati di laboratorio ottenuti su più procedure analitiche	228		

LETTERE ALL'EDITORE - LETTERS TO THE EDITOR

Esame emocromocitometrico: telemedicina e competenze	348
------------------------------------------------------	-----

INDICE

<hr/> NOTIZIE SIBioC - SIBioC NEWS <hr/>		Paziente pediatrico con oliguria e adenopatia cervicale: il ruolo degli analizzatori a cattura di immagine per l'esame standard delle urine	e20
In ricordo di Jillian (Jill) Tate	115		
Jill Tate: Mentoring as a life legacy	116	Sofferenza tubulare in un paziente con recente trapianto di rene	e25
Lab Tests Online: un successo che parte da lontano	245	Una malattia neurologica di difficile inquadramento	e28
In memoria del Professor Howard A. Morris	248	La ricerca degli anticorpi anti-nucleo non è sempre di facile interpretazione	e31
2019 AACC Outstanding Contributions Through Service to the Profession of Clinical Chemistry Award	249	Una paziente con dolori ossei diffusi: il ruolo del laboratorio nel diagnosticarne la causa	e35
<hr/> RECENSIONI - BOOK REVIEW <hr/>			
Approccio alla chimica clinica	244	Un caso clinico di linfocitosi persistente	e38
<hr/> CASI CLINICI - CASE REPORTS <hr/>			
Un caso di linfadenopatia, epatosplenomegalia e triptasi elevata	e1		
Valutazione della risposta alla terapia in un paziente con amiloidosi AL e basse concentrazioni della catena leggera libera monoclonale	e4		
Caso di emofilia A acquisita in paziente con sanguinamento endooculare	e7		
Astenia e urine intensamente colorate: una associazione da indagare attentamente	e9		
Un effettivo vantaggio dello screening neonatale allargato	e12		
Utilità dell'esame citologico del liquido cerebrospinale	e17		

Volume 43, 2019

Indice degli autori

Index of authors

Acquaviva F.	e1, e12	Bonetti G.	106, 200, 335
Adami F.	366, 421	Bonfanti L.	296
Agnello L.	289	Borrillo F.	435
Aita A.	14, 135, 424	Bourlot G.	e7, e9
Albano L.	e1, e12	Bozzola M.	357
Alfonso Perrone M.	424	Bracale U. M.	289
Aliustaoglu A.	274	Brando B.	90, 187
Ammirabile M.	424, e4	Brenna S.	115, 244
Anderlini R.	e7, e20	Brugnoni D.	106, 228
Angeloni A.	e25	Bucchioni P.	449
Antonelli G.	14, 135	Buoro S.	348, 384
Appiani A.	321	Buttitta F.	305
Asfhar H.	44, 150	Cabodi D.	321
Bachetoni A.	e25	Calosso L.	e7, e9
Baldon M.	67, 168	Canali C.	e7, e20
Banfi G.	76, 178	Capoluongo E.	305, 312, 406
Barberis M.	305	Caporale R.	e38
Bartolini A.	394	Cariati F.	424, 435
Bassan G.	44, 150	Carobene A.	228, 384
Bella M. A.	305	Carraro P.	44, 150
Bellini C.	424	Carrera P.	305
Benati M.	279, 424	Carta M.	13, 125
Berardi M.	116, 245	Casagrande I.	296
Bernardini S.	76, 178, 424	Cascino P.	357
Berno T.	366	Castaldo G.	312
Bertone F.	321	Cavallo M. R.	e7, e9
Bigiani N.	e7, e20	Cavazza M.	296
Bondanini F.	76, 178	Cenci A. M.	90, 187

Ceriotti F.	106, 228, 269, 384, e4, e17	Dominoni P.	384
Cervellin G.	296	Dorizzi R.	76, 178
Cesari F.	e38	Elisabetta G.	399
Ciaccio M.	289, 312, 340	Falciani V.	e31
Clerico A.	296	Fanelli A.	e38
Colombo N.	305	Fania L.	406
Conterio V.	321	Favaretto D.	449
Conti L.	76, 178	Favresse J.	424
Cortesi L.	305	Fecarotta S.	e1, e12
Costantini A.	e31	Feo Ferrara C.	76, 178
Crisci D.	e1, e12	Ferrara L.	e35
Crivelli F.	90, 187	Ferraris Fusarini C.	e4
Curcio F.	90, 187	Flagiello C.	e1, e12
Da Rin G.	348, 394	Fortunato G.	289
Dabla P. K.	424	Fortunato A.	e31
D'Alessandro A.	e7, e9	Francesca G.	399
D'Alessandro M.	e25	Frisso G.	e1, e12
Danese E.	264, 279	Fuso A.	413
Danesi R.	312	Gallo G.	e1, e12
D'Argenio V.	424, 435	Garolfo M.	e25
De Bonis M.	406	Gennari W.	e7, e20
De Corato P.	269	Geruardi M.	305
De Liso F.	269	Giacobbe C.	289
De Paolis E.	406	Gianluca G.	399
De Santis E.	e28	Giardini R.	90, 187
Debbia D.	e35	Giavarina D.	11, 13, 106, 123, 125, 200, 296, 335
Del Guercio L.	289	Gion M.	305
Del Ninno L.	44, 150	Gori S.	305
Del Re M.	312	Granero V.	e7, e9
Demicheli M. S.	321	Graziani M. S.	11, 123, 248, 249, 366, e1, e4
Di Maggio F.	435	Guarneri V.	305
Di Taranto M. D.	289	Gusella M.	279
Dittadi R.	44, 106, 150, 228	Iacoviello M.	399
Doğan N.	285		

Ialongo C.	424	Mondanese A.	335
Incorvaia L.	312	Montagnana M.	279, 296
Jance B.	e38	Montaruli B.	321
Keskin O.	274	Morelli B.	321
Köken T.	285	Mosca A.	255
La Verde N.	305	Muccini E.	321
Lazzarino G.	e25	Natali P.	e35
Lessi F.	366	Negrini D.	264
Letizia V.	399	Nevone A.	357
Lippi G.	264, 279, 296, 335, 340, 384	Nolano A.	e1, e12
Lo Sasso B.	289	Normanno N.	305
Longo G.	e35	Novelli C.	321
Lorusso D.	305	Nuvolone M.	357, 424
Lucarelli M.	413	Olivieri O.	264
Magliano E.	90, 187	Orcun A.	274
Maiavacca R.	269, e4, e17	Ottomano C.	90, 187, 384
Maldari L.	269, e4	Pacifici R.	449
Mancini R.	76, 178	Padoan A.	14, 106, 135, 228, 335
Manenti B.	384	Palladini G.	264, 357
Manieri G.	e7, e20	Palma D.	289
Marchetti A.	305, 312	Parenti G.	e1, e12
Marchetti P.	305	Pascone R.	e25
Maregnani A.	e4	Pasini F.	279
Mattioli S.	106, 228	Pasini B.	305
Mazzaccara C.	e1, e12	Patrucco G.	24, 143
Melegari A.	e28	Pauri P.	296
Merlini G.	355	Paviati E.	279
Micca G.	24, 143	Pecce R.	e1, e12
Miconi V.	90, 187	Pellegrini C.	424
Mignone F.	406	Pensabene M.	305
Milani P.	264	Peruzzi B.	e38
Minicozzi A. M.	279	Peyronel E.	e7, e9
Minola G.	67, 173	Pichini S.	449
Mirra B.	e1, e12	Pignata S.	305

Pizzolo F.	264	Spolaore F.	424
Plebani M.	14, 52, 59, 67, 76, 135, 156, 162, 168, 178, 340, 424	Stioui S.	90, 187
Polesello V.	44, 150	Tagliaferri P.	305
Poli L.	e25	Taie S. F.	424
Portalupi M. R.	321	Tarim B. A.	274
Pradella P.	321	Tassone P.	305
Prestigio S.	321	Tavazzi B.	e25
Pretagostini R.	e25	Tavio M.	296
Radice P.	305	Tezcan M. E.	274
Rampoldi E.	296	Tomaiuolo R.	435
Redi A.	e1, e12	Torresani E.	90, 187
Renzi C.	424	Travaglino A.	289
Ricevuto E.	305	Trenti T.	76, 178, 296, e7, e20, e28, e35
Riva M.	366	Trevisol C.	305
Rogolino A.	e38	Truini M.	305, 312
Rosada M.	44, 150	Varani M.	e7, e20, e35
Ruoppolo M.	e1, e12	Varesco L.	305
Russo A.	305, 312	Velts-Lindh A.	424
Salvadori B.	e38	Vidali M.	106, 228
Salvagno G. L.	264, 424	Villani G. R. D.	e1, e12
Sancesario G.	424	Zaltron C.	264
Sapino A.	305	Zambelli F.	e7, e20
Sara V.	399	Zaninotto M.	11, 90, 123, 187, 340
Sargentini V.	e25	Zoppelletto M.	394
Savoia M.	289		
Scaglione G. L.	406		
Scapaticci M.	394		
Sciacovelli L.	14, 67, 106, 135, 168, 228		
Secchiero S.	67, 168		
Seghezzi M.	384		
Silvestri S.	e31		
Sina C.	e4		
Speroni M.	269		

SAVE the DATE



52^o CONGRESSO NAZIONALE SIBioC-Medicina di Laboratorio



6-8 Ottobre 2020

BARI - Fiera del Levante

un evento
organizzato da



BIO MEDIA
La condivisione del sapere



CORSI FAD ECM **SIBioC** 2020

CORSO BASE DI COAGULAZIONE PARTE I: FISIOLOGIA DELL'EMOSTASI, METODOLOGIE DI INDAGINE, CONTROLLO DI QUALITÀ

Benedetto Morelli

12 crediti ECM

CORSO BASE DI COAGULAZIONE PARTE II: I TEST DI SCREENING DELL'EMOSTASI

Benedetto Morelli

12 crediti ECM

COME SI SCRIVE UN CONTRIBUTO SCIENTIFICO

Maria Stella Graziani

12 crediti ECM

VARIABILI PREANALITICHE IN MEDICINA DI LABORATORIO

Davide Giavarina, Graziella Bonetti

8 crediti ECM

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

STAT PROFILE
Prime+[®]

L'evoluzione tecnologica nel Critical Care Testing

Fino a 22 Analiti, compresi
importanti test:



Tecnologia Nova MicroSensor
Card™ senza Manutenzione

CQ liquido automatico
e preciso

Protezione Clot Block™

Menù:

pH, PCO_2 , PO_2 , Na, K, Cl, iCa,
iMg, Glu, Lac, Urea (BUN),
Creat, Hct, TCO_2 , $SO_2\%$, O_2Hb ,
COHb, MetHb, HHb, tBil,
tHb, HbF



nova[®]
biomedical
novabio.us.it

Nova Biomedical Italia S.r.l.
Via Como 19 - 20020 Lainate (MI)
Tel. +39 02 87070041
it-info@novabio.com





BIO MEDIA

La condivisione del sapere

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



**Provider ECM
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria
Società Scientifiche**



Casa Editrice



**Servizi web e strategie
di comunicazione**



**Family Health
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

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