Dicembre 2018 4

BC

biochimica clinica

Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale - D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004 n° 46) art. 1, comma 1, LO/MI

In questo numero:

ANTIGENE PROSTATICO SPECIFICO
vedi pag. 281, 318, 321

TUMORE EREDITARIO DELLA MAMMELLA
vedi pag. 285

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

ISSN 0393 - 0564

volume 42

sommario

4

EDITORIALI

281 Appropriatezza degli esami di screening oncologici: il caso dell'antigene prostatico specifico
D. Giavarina

283 Il documento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sulla diagnostica in vitro: una riflessione critica è necessaria
F. Ceriotti, M.S. Graziani

RASSEGNE

285 Il ruolo di tecniche di sequenziamento genico ad elevata produttività per la diagnosi molecolare dei tumori ereditari della mammella
F. Starnone, M.V. Esposito, M. Nunziato, F. Di Maggio, V. D'Argenio

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

294 Un nuovo ruolo del CYP2R1 nella sclerosi multipla
L. Agnello, C. Scazzone, P. Ragonese, G. Bivona, B. Lo Sasso, S. Milano, G. Salemi, C. Bellia, M. Ciaccio

300 Sicurezza del paziente e rischio clinico nel processo ematologico di laboratorio
A. Aita, F. Tosato, F. Balboni, A. Fanelli, G. Da Rin, M. Gioia, S. Francione, M.L. Ciardelli, C. Scapellato, R. Guerranti, M. Quercioli, P. Pezzati, A. Tomei, A. Bassi, S. Buoro

313 Disposizioni normative in Italia per la gestione dei Point of Care Testing: un'indagine SIBioC nelle regioni italiane
E. Rampoldi, G. Patrucco

OPINIONI

318 Qualità delle raccomandazioni o raccomandazioni di qualità? Il caso dell'antigene prostatico specifico nello screening del carcinoma della prostata
M. Plebani

321 Antigene prostatico specifico, screening del cancro della prostata, linee guida e il giudice saggio
M. Gion

327 Diagnostica di laboratorio del rischio nefrolitiasico
G. Cangiano, E. Di Maina, G. Buccino, A. Errico, P. Improta, A. Latte, M. Capuano, R. Rossano, A. Apuzzo, A. Lamanna, C. Polito, F. Nuzzi, M.D'Amora, A. Tufano, A. Sarappa

DOCUMENTI

335 Medicina di laboratorio e Medicina d'urgenza: un connubio indissolubile
G. Lippi, F. Balboni, L. Bonfanti, P. Carraro, M. Cavazza, D. Coen, G. Da Rin, R. Lerza, C. Madia, M. Montagnana, C. Paolillo, G. Sancesario, L. Zardo, G. Cervellin

DOCUMENTI SIBioC

343 Specifiche di qualità, terminologia e definizione dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T
A. Clerico, M. Zaninotto, M.S. Graziani, M. Mion, S. Masotti, C. Prontera, M. Migliardi, A. Fortunato, M. Plebani

LETTERE ALL'EDITORE

347 I laboratori sono in grado di rispondere ai requisiti previsti dalla norma EN ISO 15189 per la Valutazione Esterna di Qualità? Studio esplorativo sui laboratori toscani per i più comuni misurandi di chimica clinica
G. Avveduto, P. Pezzati, M. Quercioli

NOTIZIE SIBioC

350 155° Course, International School of Medical Sciences Ettore Majorana Foundation and Centre for Scientific Culture
M. Ciaccio

sommario

CASI CLINICI

e47 Tre neonati con sindrome di Down ed alterazioni ematologiche
B. Manenti, M. Seghezzi, P. Dominoni, S. Buoro

e50 Sinergia tra esperienza dell'operatore e analizzatori del sedimento urinario nella diagnosi di infezione da Poliomavirus BK
B. Bernardi, G. Bonfant, P. Belfanti, A. Molino, M. Manes, M. Di Benedetto

e53 Il contributo della misura delle catene leggere libere plasmatiche alla diagnostica della malattia da deposito delle catene leggere
L. Demarinis, T. Troiano, M. Rossini, V. Montinaro, P. Curci, S. De Francesco, F. di Serio, L. Gesualdo, C. Manno

e56 Individuazione e identificazione di una nuova variante emoglobinica durante la quantificazione dell'emoglobina glicata
I. Crespi, M.P. Campisi, D. Duranti, R. Serino, E. Saliva, M. Marchiando, L. Miglio, G. Barberio, G. Ivaldi, M. Mogni, M. Maffei, G. Bellomo

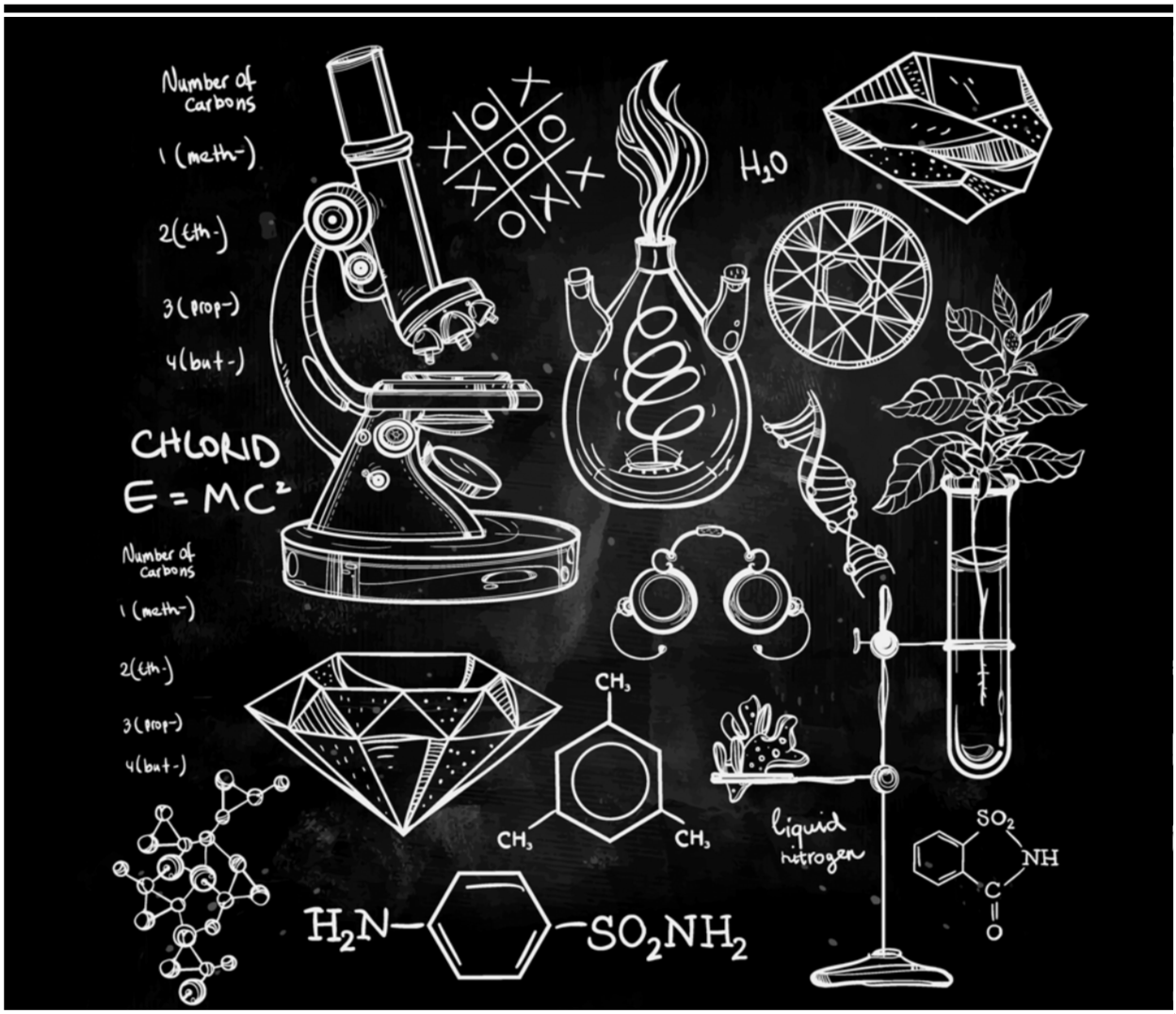
È DISPONIBILE IL NUOVO VOLUME

Medicina di Laboratorio SIBioC

BC biochimica clinica

CASI CLINICI IN MEDICINA DI LABORATORIO

A cura di
MARIA STELLA GRAZIANI e MAURO PANTEGHINI



Per saperne di più
www.biomedia.net

BioMedia editore

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

Reviews Editor
Martina Zaninotto

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

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

Editorial Secretary
Lucrezia Monterisi
biochimica.clinica@sibioc.it
Biomedia srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
Tel. 0245498282
Fax 0245498199
www.bc.sibioc.it

Responsible Editor
Giuseppe Agosta

Publisher
Biomedia srl
Via L. Temolo 4
20126 Milano
www.biomedia.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
Biomedia srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282 - Fax. 0245498199

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

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

Volume 42
Numero 4 - Dicembre 2018

Autorizzazione del Tribunale di Milano n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione
Biomedia 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.

Appropriatezza degli esami di screening oncologici: il caso dell'antigene prostatico specifico

Davide Giavarina
Laboratorio Analisi Cliniche, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Berica, Vicenza

Al congresso di "Whatchamacallit", il moderatore terminò la presentazione e Tom Dick, professore ordinario di tutte le chirurgie possibili e immaginabili nella più blasonata università europea salì sul podio. Con forza espositiva senza pari e con una chiarezza di termini da rendere semplice anche il più complicato e astruso degli argomenti al più inetto degli esseri umani spiegò, in poche e taglienti diapositive, come il 70% degli interventi che tutti i chirurghi fanno quotidianamente in ogni regione e ospedale d'Italia, d'Europa, per non dire del mondo, fossero inutili; mostrò quanti esami istologici e autoptici gridavano all'umanità l'inappropriatezza degli interventi condotti e delle scelte operative, e quante cistifellee, tonsille, linfonodi, appendici, noduli avrebbero potuto rimanere al loro posto senza alcun nocumento al paziente, anzi, e con grande risparmio di risorse per il sistema sanitario.

Fra il pubblico ci fu un'ovazione. Non era la prima volta. Da anni si discuteva dell'appropriatezza chirurgica, ma questa relazione sigillava e chiariva una volta per tutte che gli sforzi per ridurre le chirurgie, chiudere gli ospedali, azzerare le scuole di specialità, centralizzare le attività in super-mega-chirurgie regionali, aveva un senso; di più, era l'unica cosa sensata, come del resto dimostravano gli ultimi sessanta congressi sul tema. E oramai, ogni energia era rivolta a definire gli ambiti sempre più stretti dove ammettere l'utilità delle operazioni chirurgiche, tranne per coloro che, pagati a prestazione come privati dal sistema pubblico, emettevano regolare fattura; …ma si sa, il conflitto di interessi…

Molti lettori a questo punto staranno pensando di aver sbagliato rivista e in ogni caso il racconto non suonerà affatto realistico. Ma se si prova a cambiare Chirurgo con Laboratorista, e intervento chirurgico con esame di laboratorio, il quadro si compone.

I laboratoristi, per certi versi, sono un po' peculiari. Di tutte le professioni sanitarie, solamente i professionisti di questa disciplina sembrano avere particolare cura, attenzione ma forse anche piacere nel denigrare il loro stesso operato e nel dimostrare quando sia inefficiente l'uso degli esami biochimici, anche se non per propria colpa. Da anni, il tema dell'appropriatezza sferza il nostro mondo, stigmatizzando un ipotizzato sovra-uso dei test diagnostici. Il problema dell'appropriatezza tuttavia è più complesso di questa semplicistica e sostanzialmente inesatta visione. Impatta nei percorsi diagnostico-terapeutici dei pazienti e negli esiti che si ottengono, e pone una sfida di armonizzazione tra laboratori, che troppo spesso rispondono in maniera molto differente allo stesso quesito diagnostico. Ma, come fanno i chirurghi, (ma anche i clinici medici, i radiologi, gli anatomo-patologi, i ginecologi, e così via), è forse giunto il momento di ragionare su cosa va fatto, e non più su cosa è in eccesso, inutile, deleterio.

In questo numero di Biochimica Clinica, due autorevoli esperti della medicina di laboratorio, italiana e internazionale, discutono di un particolare caso dell'appropriatezza in medicina di laboratorio: gli esami di screening e, nello specifico, il caso dell'antigene prostatico specifico (PSA) (1,2).

L'uso degli esami di laboratorio per individuare patologie in soggetti sani è forse la pratica più esposta a discussioni e critiche, poiché rappresenta la condizione peggiore per un esame: una probabilità pre-test molto bassa. Anche esami dotati di caratteristiche ottimali, con elevata sensibilità e specificità, accusano comunque e sempre una percentuale, anche se minima, di falsi positivi. Ma, se la popolazione cui si applica l'esame è prevalentemente sana, ossia negativa, il numero dei falsi positivi sarà rilevante. Le buone pratiche di Medicina di Laboratorio Basata sull'Evidenza (EBLM) raccomandano infatti di eseguire un esame solo quando la probabilità pre-test sia almeno del 15-20%. Ma negli screening, la probabilità pre-test è quasi sempre molto inferiore all'1%, in alcuni casi anche all' 1‰, ed ecco che allora l'efficienza dell'esame risulta scarsa, generando conseguenti raccomandazioni contro l'uso di quell'esame come screening.

Come si fa ad aumentare la probabilità pre-test? Con la clinica: la storia, i segni e i sintomi, l'esame obiettivo. Tuttavia, anche queste procedure hanno una fallibilità,

Corrispondenza a: Davide Giavarina, Laboratorio Analisi, AULSS 8 – Berica, Ospedale San Bortolo, Viale Mons. Rodolfi 37, 36100, Vicenza. E-mail davide.giavarina@aulss8.veneto.it

Ricevuto: 17.07.2018 Revisionato: 18.07.2018 Accettato: 18.07.2018

Pubblicato on-line: 14.09.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.052

possono non essere abbastanza specifiche e, soprattutto, spesso non sono sufficientemente sensibili, specie nelle fasi precoci di malattia. Qualche decennio fa, da parte di uno degli indiscussi Maestri della nostra disciplina, era stata proposta l'idea dell'*Esame obiettivo di Laboratorio* (3), con l'idea che gli esami di laboratorio potessero potenziare i sensi del medico e aumentare il numero di dati e informazioni a lui disponibili, per la valutazione del paziente.

Sulla base di esami di primo livello, assieme al contesto clinico, risulta più facile fare le prime ipotesi ed avere maggiori argomenti, sia nel processo diagnostico, sia per le decisioni sulle azioni successive. È il ragionamento che propone Mario Plebani (1): non rinunciare a informazioni potenzialmente utili, solamente perché possono non essere definitive oppure troppo affinate, ma sfruttare la logica diagnostica, attraverso la competenza dei clinici, ma anche e senza dubbio dei professionisti di laboratorio, sia nel scegliere gli esami appropriati, sia soprattutto nel valutarli e utilizzarli, nel corretto contesto clinico del singolo paziente. Non si può, in altre parole, rinunciare ad utilizzare strumenti molto sensibili e precoci, solamente perché debbono essere contestualizzati nel quadro clinico e utilizzati con la logica diagnostica del laboratorio. L'esempio, molto recente, delle troponine ad alta sensibilità, con il loro dilemma di precocità di segnale, migliore predittività, specificità di genere, ma con la controparte di riconoscere ogni tipo di danno del miocita, anche non acuto, spiega molto bene il concetto.

Il punto particolare di discussione proposto dai due articoli in questo numero sta però nel fatto che un percorso diagnostico terapeutico per il cancro alla prostata che si basi sul PSA, incontra obbligatoriamente passaggi successivi di approfondimento diagnostico, e poi di trattamento preventivo e curativo, che hanno pesanti effetti sui pazienti, in termini di disturbi intestinali, ma soprattutto di impotenza ed incontinenza. Confrontati con i dati di mortalità e di sopravvivenza, le prove per sostenere programmi di screening sono per lo meno controverse. In realtà, i dubbi sembrano più essere su un atteggiamento interventista piuttosto che conservativo. Purtroppo, non fare l'esame sembra essere una scelta a priori di tipo conservativo: non richiedo/eseguo l'esame, così non mi pongo il problema se debbo approfondire e trattare o meno. Massimo Gion (2) offre una particolareggiata e completa disamina delle evidenze disponibili, circa i benefici e i rischi di una scelta o di un'altra, discutendo anche i documenti che riassumono le evidenze disponibili, le revisioni secondarie e i documenti di sintesi.

I due articoli proposti sono tuttavia solo apparentemente un pro e contro su un tema che ha avuto moltissimi sostenitori e detrattori, anche in importanti società scientifiche di specialità. In realtà, essi offrono uno specchio interessantissimo e di grande valore del modo scientifico di pensare in Medicina di Laboratorio, mostrando la complessità e la profondità con cui debbono essere affrontati i temi della diagnostica biochimica. Soprattutto, l'appropriatezza in particolare non dovrebbe essere semplicemente demandata ai prescrittori, per poi decidere eventualmente di disapprovarne l'applicazione *tout-court*.

Massimo Gion, con una citazione manzoniana, conclude che probabilmente hanno ragione sia lui sia Mario Plebani. Credo veramente che questa conclusione possa essere condivisa, e convenire sulla conclusione di Mario Plebani: *"…l'esame di laboratorio diviene diagnosi se richiesto in modo appropriato, con il consenso informato del paziente, ed interpretato correttamente nel contesto clinico. Il fai da sé in Medicina di Laboratorio non solo è costoso per il Sistema Sanitario, ma soprattutto compromette la sicurezza del paziente e la qualità delle cure"*.

In ogni caso, e comunque la si pensi, due letture profonde e avvincenti.

BIBLIOGRAFIA

1 Plebani M. Qualità delle raccomandazioni o raccomandazioni di qualità? Il caso del PSA nello screening del carcinoma della prostata. Biochim Clin 2018;42:326-8.
2 Gion M. PSA, screening del cancro della prostata, linee guida e il giudice saggio. Biochim Clin 2018;42:329-34.
3 Burlina A. La logica Diagnostica del Laboratorio. Piccin ed, Padova, 1998.

Il documento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sulla diagnostica in vitro: una riflessione critica è necessaria

Ferruccio Ceriotti[1], Maria Stella Graziani[2]
[1]Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano
[2]Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

Nello scorso mese di maggio, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha reso disponibile un documento denominato "Model List of Essential in Vitro Diagnostics" che costituisce un catalogo degli esami di laboratorio che dovrebbero essere universalmente disponibili per la diagnosi e la cura delle più comuni condizioni cliniche (1).

La pubblicazione di questo documento deve senza dubbio essere salutata come un importante contributo al processo che impegna i governi alla costruzione del repertorio degli esami di laboratorio di base (essenziali), che dovrebbero essere disponibili in ogni tipologia di servizio sanitario e affianca il "WHO Model List of Essential Medicines" che è il corrispondente catalogo dedicato ai farmaci.

Il documento ha il pregio di riconoscere alla diagnostica di laboratorio un ruolo essenziale per le tre priorità strategiche del WHO: migliorare la copertura sanitaria universale, affrontare le emergenze sanitare e promuovere popolazioni più sane.

Una attenta lettura del documento rivela tuttavia alcune criticità che ci sembra necessario portare alla attenzione dei laboratoristi Italiani, dopo essere stato oggetto di riflessioni analoghe a livello internazionale (2,3).

Anche se non dichiarato espressamente, è assolutamente evidente che il documento è strutturato per situazioni sanitarie di Paesi in via di sviluppo in cui la grande prevalenza delle patologie è ancora di tipo infettivo e la maggior parte della popolazione non ha accesso a servizi di medicina di laboratorio. Questo approccio ovviamente condiziona la struttura del documento e lo rende poco applicabile a realtà quale quella italiana.

Nel documento, i servizi di laboratorio sono suddivisi in 4 livelli disposti a piramide: dal primo (di base) nel quale non è previsto personale specificamente formato per il laboratorio ed in cui si utilizzano sistemi analitici da "self testing" e come materiale urina o sangue capillare, al quarto costituito dai laboratori di riferimento passando dai laboratori degli ospedali locali ai laboratori degli ospedali regionali ad alta specialità. Alla base della piramide si trovano i numerosi servizi che offrono esami di laboratorio di base ad un numero elevato di pazienti; il numero dei servizi e dei pazienti si riduce mano a mano che si sale nel livello di specializzazione e si raggiunge il vertice della piramide. L'organizzazione descritta riflette il modello definito "hub & spoke" che molti sistemi sanitari nazionali (SSN) stanno implementando, in particolare nel mondo occidentale (4). Tuttavia è da osservare che questo modello non è uniformemente adottato nel mondo: non solo non è ancora del tutto pienamente funzionante in molte realtà dei Paesi occidentali, ma questo tipo di riorganizzazione deve ancora essere affrontata dalla maggior parte dei SSN nel mondo. Ciononostante, nel documento gli esami diagnostici vengono suddivisi in due elenchi separati, il primo è dedicato ai servizi di laboratorio di base (I livello) e il secondo ai servizi di laboratorio dei livelli successivi (II, III e IV). È evidente che elenchi così costruiti non sono facilmente adottabili da tutti i Paesi, indipendentemente dal modello organizzativo adottato nel singolo Stato. D'altra parte, proporre elenchi diversi a seconda del grado di evoluzione del SSN in vigore avrebbe senza dubbio costituito un problema etico maggiore perché avrebbe di fatto significato separare i Paesi con un SSN sviluppato, dagli altri con SSN più in via di sviluppo. Inoltre, considerato che uno degli scopi dichiarati del documento è quello di servire da guida ed essere di riferimento per gli Stati membri che devono costruire o aggiornare il proprio repertorio di esami diagnostici essenziali (1), una possibile conseguenza, potenzialmente preoccupante anche se improbabile data l'impostazione del documento, è che nel nostro Paese questo elenco possa essere usato per modificare (in diminuzione) il catalogo delle prestazioni essenziali.

Entrando più nello specifico dei contenuti dell'elenco, gli esami sono suddivisi in sezioni (chimica clinica, ematologia, microbiologia) e sono elencati anche in relazione ad un numero di condizioni cliniche nelle quali gli esami sono suggeriti. In generale si può osservare che gli esami della sezione microbiologia e sierologia, proprio per le considerazioni fatte in precedenza sulla

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

Ricevuto: 02.10.2018 Revisionato: 08.10.2018 Accettato: 09.10.2018

Pubblicato on-line: 31.10.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.064

impostazione del documento, sono molto meglio documentati degli esami di chimica clinica ed ematologia, ovvero accompagnati da riferimenti di altri documenti dell'OMS, del tutto assenti per la chimica clinica in cui, oltre ad essere presenti degli errori, molte delle indicazioni non appaiono aggiornate.

Sicuramente alcune indicazioni relative agli esami di chimica clinica sono errate e necessitano di essere corrette. In particolare, per identificare/monitorare condizioni di malnutrizione viene indicato come esame di primo livello l'albuminuria misurata con la striscia reattiva. Ovviamente, l'albuminuria è in grado di indicare solo un danno renale, mentre l'esame necessario sarebbe l'albumina plasmatica/sierica, esame che però non esiste sotto forma di analisi eseguibile su sangue capillare. Proprio perché ci si riferisce a situazioni in cui l'accesso ad un servizio di laboratorio è problematico, per la diagnosi di diabete, è suggerito il glucometro per la misura della glicemia e la glicosuria come parametro da utilizzare sia per la diagnosi che per il monitoraggio, anche se queste indicazioni sono in contrasto con le più recenti e accreditate linee guida (5). Per la diagnosi di pancreatite sono suggerite sia amilasi che lipasi, ma il campione indicato è sia plasma/siero che urine, ma la misura nelle urine ha scarsissimo significato clinico, soprattutto per la diagnosi di una patologia acuta. Il rapporto albumina/globluline, che è compreso all'interno del pannello definito metabolico allargato, è un parametro alquanto obsoleto, di nessun significato clinico. Si possono notare inoltre alcune importanti assenze, particolarmente significative nella lista degli esami disponibili per i livelli da II a IV; fra queste vale la pena di segnalare il tempo di tromboplastina parziale attivata, e il D-dimero tra gli esami di coagulazione, creatinchinasi, lattato deidrogenasi, e tireotropina per la chimica clinica e la assoluta mancanza di programmi di screening come ad esempio il sangue occulto fecale e tireotropina nei neonati.

Come riportato all'inizio, il documento appare stilato da esperti di patologie infettive, mentre il resto del laboratorio è sicuramente meno rappresentato.
Fortunatamente e meritoriamente, il documento prevede una sua prima revisione, che nelle intenzioni dovrebbe essere rilasciata nel maggio 2019 (6). Per espressa dichiarazione dell'OMS, la richiesta di modifiche al catalogo o per l'inserimento di nuovi esami di provata accuratezza diagnostica potrà essere inviata dagli uffici regionali o nazionali dell'OMS, come pure da altri "stakeholders", quali i governi, le industrie del diagnostico, le università. Le federazioni internazionali e regionali delle società scientifiche di settore (EFLM e IFCC) come pure le società scientifiche nazionali della medicina di laboratorio non vengono espressamente menzionate tra gli "stakeholders", ma riteniamo che non possano esimersi dal partecipare attivamente alla costruzione della seconda edizione del catalogo in modo che questo documento possa realmente diventare uno strumento utile alla diffusione universale delle opportunità di cura.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organisation. Model List of Essential in Vitro Diagnostics. First Edition 2018. http://www.who.int/medical_devices/diagnostics/WHO_EDL_2018.pdf?ua=1 (ultimo accesso: settembre 2018).
2. Delanghe JR. The new WHO list of essential diagnostic tests: a clinical chemist's perspective. Clin Chim Acta 2018;485:42-3.
3. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. The model list of essential in vitro diagnostic: nuisance or opportunity? Diagnosis (Berl) 2018. doi 10.1515//dx-2018-0035.
4. Plebani M. Clinical laboratory: bigger is not always better. Diagnosis (Berl) 2018;5:41-6.
5. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. Diabetes Care 2018;41:S13-S27.
6. http://www.who.int/medical_devices/diagnostics/WHO_Essential_Diagnostics_List_2019_application/en/ (ultimo accesso: settembre 2018).

Il ruolo di tecniche di sequenziamento genico ad elevata produttività per la diagnosi molecolare dei tumori ereditari della mammella

Flavio Starnone[1,2], **Maria Valeria Esposito**[1,2], **Marcella Nunziato**[1,2], **Federica Di Maggio**[1,2], **Valeria D'Argenio**[1,2]
[1]CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via G. Salvatore 486, Napoli
[2]Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Sergio Pansini 5, Napoli

ABSTRACT

Role of next generation sequencing technologies for the molecular diagnosis of hereditary breast cancers. Breast cancer (BC) is still the most common tumor in women worldwide. Up to 20-25% of all BCs are of hereditary-familial nature and can be related to germline predisposing-mutations of which the most relevant are present in the high penetrance-genes *BRCA1* and *BRCA2*. These mutations escalate the lifetime risk of BCs and also of other cancers. Thus, their early identification in tumor-prone family members is important to improve the clinical management of patients and their families. In addition, despite their high penetrance, only a small fraction of patients carry *BRCA1* or *BRCA2* mutations. This suggests that familial BCs may be related to germline mutations in other high-, moderate- and low-penetrance cancer genes. Consequently, the request for laboratory methods able to detect cancer-related pathogenic mutations in a short time and with high accuracy and sensitivity is raised. Recent technological advances in next generation sequencing (NGS) methods development are showing their potential also in this field. Indeed, NGS-based approaches are now currently used for BRCA genes analysis superseding conventional approaches. Moreover, the possibility to simultaneously sequence a panel of target genes is effective to further investigate patients with a personal and/or family history suggestive for an inherited BCs but with no mutations after BRCA molecular test. Implementation of this second-level molecular screening in routine diagnostic workflow will increase the diagnostic sensitivity and improve the management of both patients and their families. In addition, these methodologies could lead to the identification of other BC-related genes, thereby increasing knowledge about hereditary BCs molecular bases.

INTRODUZIONE

Il tumore al seno costituisce il 25% di tutti i casi di tumore e rappresenta, ancora oggi, la neoplasia più frequente nel sesso femminile in tutto il mondo. Solo nel 2012, sono stati registrati 1.671.149 nuovi casi e 521.907 decessi legati a tale patologia (1).

L'incidenza del tumore al seno comincia ad aumentare nei primi anni '80, probabilmente in seguito ai costanti e rapidi cambiamenti relativi sia allo stile di vita (alimentazione, terapie ormonali, fumo di sigaretta) sia agli effetti dello sviluppo industriale (2-4). Negli anni '90, l'avvento dei programmi di screening mammografico ha evidenziato l'importanza di individuare il tumore al seno ad uno stadio precoce, in modo da poter attivare tempestivamente interventi terapeutici e/o di prevenzione, e questo ha portato ad una riduzione della mortalità (2-4). All'inizio del XXI secolo si è osservata una diminuzione del trend d'incidenza, specialmente nel Nord America e nei paesi Nord Europei (2-4).

Da un punto di vista epidemiologico, l'incidenza del cancro della mammella presenta un'ampia variabilità geografica. Il picco maggiore si registra nel Nord America dove si contano ogni anno 90 nuovi casi della malattia su 100.000 donne (5). Al secondo posto, si trovano Australia ed Europa occidentale, dove la diffusione è leggermente inferiore rispetto a quella degli USA; seguono l'America centrale, il Sudamerica ed i Paesi dell'Est europeo con un rischio dimezzato rispetto all'America del Nord; infine, l'Asia e l'Africa dove la frequenza è, ad oggi, molto bassa ma mostra una tendenza in progressivo aumento. Il Giappone è l'unico Paese industrializzato dove il tumore

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, CEINGE-Biotecnologie Avanzate e Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Via G. Salvatore 486, Napoli; email: dargenio@ceinge.unina.it; tel: 081 3737909; fax: 081 3737808.

Ricevuto: 08.06.2018 Revisionato: 15.06.2018 Accettato: 15.06.2018

Pubblicato on-line: 09.10.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.059

al seno risulta meno comune (6).

In Italia, nell'ultimo anno si sono ammalati di tumore al seno circa 50.500 donne e 500 uomini. Si stima che nel nostro Paese 7 donne su 100 svilupperanno un carcinoma mammario durante il corso della loro vita (entro gli 80 anni di età). Fonti ISTAT relative all'anno 2014 hanno riportato il tumore della mammella come prima causa di morte nelle donne, in ben tre diverse fasce d'età: prima dei 50 anni, tra i 50 e i 69 e dopo i 70 anni (7). I dati dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) del 2017 confermano che il cancro al seno è la neoplasia più diagnosticata nelle donne italiane. È importante sottolineare che, nonostante l'incidenza sembri leggermente in aumento, il tasso di mortalità diminuisce; si ritiene che questo fenomeno sia dovuto non solo alla disponibilità di terapie più efficaci, quanto soprattutto all'introduzione ed alla diffusione dei programmi di screening e di prevenzione sul territorio nazionale (8). Tuttavia, se si considerano le singole regioni, l'incidenza del tumore al seno presenta una differente distribuzione tra nord e sud del Paese. In particolare, dal 2008 al 2013 si è registrata una maggiore incidenza in Italia settentrionale (162,2 casi/100.000 donne); si ritiene che ciò sia l'effetto non solo di diversi fattori di rischio ambientale presenti in alcune macro-aree, ma che sia anche la conseguenza di una maggiore e più capillare diffusione dei programmi di prevenzione e screening sui territori regionali. A conferma di tale ipotesi, il tasso di sopravvivenza a 5 anni in Italia è pari all'87%, un dato omogeneo per fascia d'età ma eterogeneo per area geografica; infatti, al sud il dato risulta essere leggermente inferiore (circa 85%) come effetto di diagnosi più tardive dovute anche ad una minore diffusione dei programmi di prevenzione (8).

Ad oggi, sono stati identificati numerosi fattori di rischio che possono influenzare la probabilità di sviluppare un carcinoma mammario durante il corso della propria vita, quali la storia mestruale, i fattori riproduttivi, l'assunzione di ormoni, la dieta e l'esercizio fisico (9). In particolare, sono generalmente considerati fattori protettivi le gravidanze in giovane età e lunghi periodi di allattamento al seno (10). I fattori di rischio riguardano principalmente l'uso di contraccettivi orali negli ultimi 10 anni (il rischio diminuisce una volta bloccata l'assunzione), l'uso della terapia ormonale combinata dopo la menopausa, pregressi cicli di radioterapia nell'area toracica, e la precedente assunzione del dietilstilbestrolo (DES). Il DES è un farmaco che è stato comunemente somministrato alle donne in gravidanza dal 1940 al 1971 per prevenire gli aborti. Si è osservato che le donne le cui madri hanno assunto DES durante la gravidanza possono avere un rischio leggermente più elevato di sviluppare il cancro al seno (11-14). Altri fattori di rischio noti riguardano l'alimentazione e lo stile di vita. L'abuso di alcol è collegato ad un aumentato rischio di sviluppare il cancro al seno, come anche l'aumento di peso e l'obesità durante l'età adulta. Dopo la menopausa, infatti, il tessuto adiposo può contribuire ad aumentare i livelli di estrogeni, aumentando il rischio di cancro al seno (15). Pertanto, l'attività fisica sotto forma di esercizio regolare, da quattro a sette ore a settimana, può essere considerata un fattore protettivo e aiutare a ridurre il rischio di cancro al seno (16).

In aggiunta a quanto discusso finora, la storia familiare, associata o meno alla presenza di specifiche alterazioni genetiche, rappresenta un altro importante fattore di rischio per lo sviluppo del tumore al seno ed identifica un gruppo di pazienti con caratteristiche prognostiche peculiari: l'individuazione precoce di queste forme eredo-familiari è fondamentale per l'attuazione delle più appropriate strategie terapeutiche e preventive dirette non solo alla paziente, ma anche ai suoi familiari (17). Pertanto, la disponibilità di specifici esami diagnostici per l'identificazione accurata di alterazioni molecolari associate ad un aumentato rischio di tumore della mammella assume un ruolo chiave nel processo diagnostico e terapeutico di questi soggetti (17-20).

In questa rassegna si vuole evidenziare il ruolo del laboratorio di biologia molecolare, ed in particolare delle tecniche di sequenziamento genico ad elevata produttività (NGS), nell'identificazione delle forme ereditarie di carcinoma della mammella, contribuendo alla diagnosi precoce e ad una migliore definizione prognostica dei singoli individui e delle loro famiglie, nell'ottica di una medicina sempre più personalizzata (21, 22).

I TUMORI DELLA MAMMELLA EREDO-FAMILIARI

È osservazione comune che alcune donne, provenienti da famiglie con numerosi casi di carcinoma della mammella, abbiano una maggiore probabilità rispetto ad altre di sviluppare un tumore al seno, spesso con insorgenza in giovane età (prima dei 40 anni). Ciò suggerisce che specifiche alterazioni molecolari, condivise all'interno della famiglia, siano in grado di aumentare il rischio di sviluppare questa patologia oncologica. Infatti, circa il 10-15% di tutti i casi di tumore della mammella sono familiari; in aggiunta, circa il 5-10% sono definiti ereditari ed associati alla presenza di specifiche mutazioni germinali ereditate con modalità autosomica dominante (23). In questo contesto, si definisce tumore ereditario della mammella e dell'ovaio (HBOC), una sindrome ereditaria in cui il rischio di sviluppare un tumore al seno (specialmente prima dei 40 anni), e/o un tumore dell'ovaio, è più alto rispetto a quello della popolazione generale. Inoltre, persone affette da tale sindrome presentano un rischio maggiore di sviluppare anche diversi altri tipi di neoplasie tra cui il tumore del pancreas, il melanoma e, negli uomini, il tumore della prostata (24).

Il cancro è considerato una malattia genetica multifattoriale, determinata dal peso di fattori ambientali su di un substrato genetico predisponente. In particolare, alterazioni geniche come sostituzioni di singole basi nucleotidiche, delezioni e altri riarrangiamenti possono alterare l'attività di oncogeni ed oncosoppressori,

promuovendo meccanismi di crescita cellulare incontrollata e la tumorigenesi. Negli anni '70 Alfred George Knudson, studiando le basi molecolari del retinoblastoma, propose il concetto genetico del "two-hits"; secondo tale teoria, una prima mutazione, responsabile della predisposizione, viene ereditata con modalità autosomica dominante con penetranza incompleta e interessa, generalmente, un gene noto come oncosoppressore; una seconda, somatica, disattiva l'altro allele e causa l'insorgenza della patologia (23). Negli anni '90 per la prima volta si associarono due geni oncosoppressori implicati nel riparo del danno al DNA, *BRCA1* e *BRCA2*, alla sindrome HBOC (23).

Le donne portatrici di una mutazione germinale in uno dei due geni BRCA presentano un aumento del rischio di sviluppare un tumore della mammella prima dei 70 anni di età pari al 57-65%, nel caso di mutazioni nel gene *BRCA1*, ed al 45-55%, per mutazioni in *BRCA2* (Figura 1); presentano inoltre un aumento del rischio di sviluppare un tumore dell'ovaio pari al 39-44% o all'11-18%, per mutazioni rispettivamente nei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Negli uomini, la presenza di una mutazione germinale a carico di uno di questi due geni determina un rischio dell'1,2% di sviluppare il tumore della mammella, per i portatori di mutazioni in *BRCA1*, e del 6,8% per i portatori di mutazioni in *BRCA2* (25).

Nonostante i tumori ereditari rappresentino una minoranza rispetto al totale dei casi di carcinoma della mammella (circa il 90%), l'alto rischio oncologico nei soggetti portatori di una mutazione rende cruciale l'individuazione precoce, attraverso un'adeguata consulenza onco-genetica, delle famiglie a rischio al fine

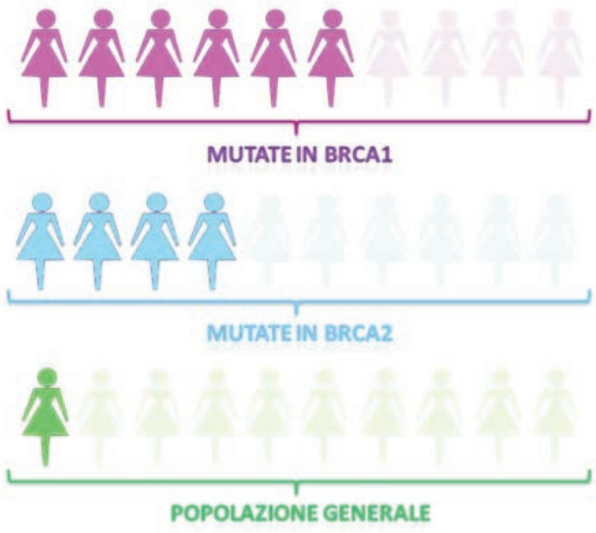


Figura 1. *Incidenza del carcinoma della mammella. La presenza di una mutazione patogenetica determina un aumento dell'incidenza del tumore della mammella di 6 volte, per mutazioni nel gene BRCA1, e 4 volte, per mutazioni in BRCA2, rispetto alla popolazione generale.*

di attuare strategie preventive e terapeutiche mirate. In questo contesto, la possibilità di offrire alle pazienti in cui si sospetti la presenza di una forma ereditaria di tumore della mammella, una indagine molecolare per l'identificazione di mutazioni patogenetiche a carico dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, assume un ruolo centrale per la corretta valutazione del rischio.

I criteri di accesso all'indagine molecolare, da valutare accuratamente in fase di consulenza onco-genetica pre-test, riguardano prevalentemente l'anamnesi familiare e personale di ciascun paziente. La Figura 2 riassume le linee guida internazionali del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) in presenza di pazienti affetti da un tumore (al seno o all'ovaio) o in presenza di persone non affette, ma con una elevata familiarità per tali patologie. Un criterio di inclusione è rappresentato dalle donne affette da tumore dell'ovaio e dagli uomini affetti da tumore della mammella, vista la minore frequenza di tali patologie, così come i casi di carcinoma mammario ad insorgenza precoce. Nel caso di pazienti con età superiore ai 50 anni, i criteri prevedono una storia personale di due tumori primari della mammella (o un parente di I grado affetto); per le pazienti con età superiore ai 60 anni è previsto il test genetico per i tumori tripli negativi [il sottotipo più aggressivo, negativo sia ai recettori ormonali che al recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2)]; negli altri casi, il test si effettua con almeno due parenti affetti (Figura 2A) (26). Specifici requisiti vanno verificati anche in presenza di persone con anamnesi personale negativa, ma con una familiarità suggestiva, ove non sia possibile effettuare il test molecolare ad un soggetto affetto (Figura 2B) (26).

Nel caso in cui un test molecolare risulti positivo (ovvero venga identificata una mutazione patogenetica a carico dei geni *BRCA1* o *BRCA2*), le linee guida prevedono un aumento della sorveglianza clinico/strumentale al fine di valutare e ridurre il rischio nelle donne portatrici. In particolare, si suggerisce di eseguire un controllo ecografico del seno ogni 6-12 mesi (in base all'età ed alla struttura della mammella). In aggiunta, le donne con età compresa tra i 25 ed i 29 anni devono effettuare una risonanza magnetica annuale; quelle con età tra i 30 ed i 75 anni devono programmare una risonanza magnetica ed una mammografia annuale. Vengono, inoltre, programmati anche altri test di screening per verificare e monitorare il rischio correlato anche all'insorgenza di altre neoplasie, quali la mappatura dei nei, la colonscopia e l'ecografia ovarica transvaginale. In alcuni casi, si può valutare la possibilità di effettuare interventi di chirurgia preventiva, quali la mastectomia o l'ovariectomia preventiva, nonché opzioni chemopreventive. Negli uomini portatori di una mutazione patogenetica è indicato eseguire un controllo ecografico del seno ogni 6-12 mesi a partire dai 35 anni di età; dopo i 40 anni si consiglia, invece, la mammografia ogni anno e lo screening per il tumore della prostata (26).

È importante sottolineare che, nonostante l'elevata

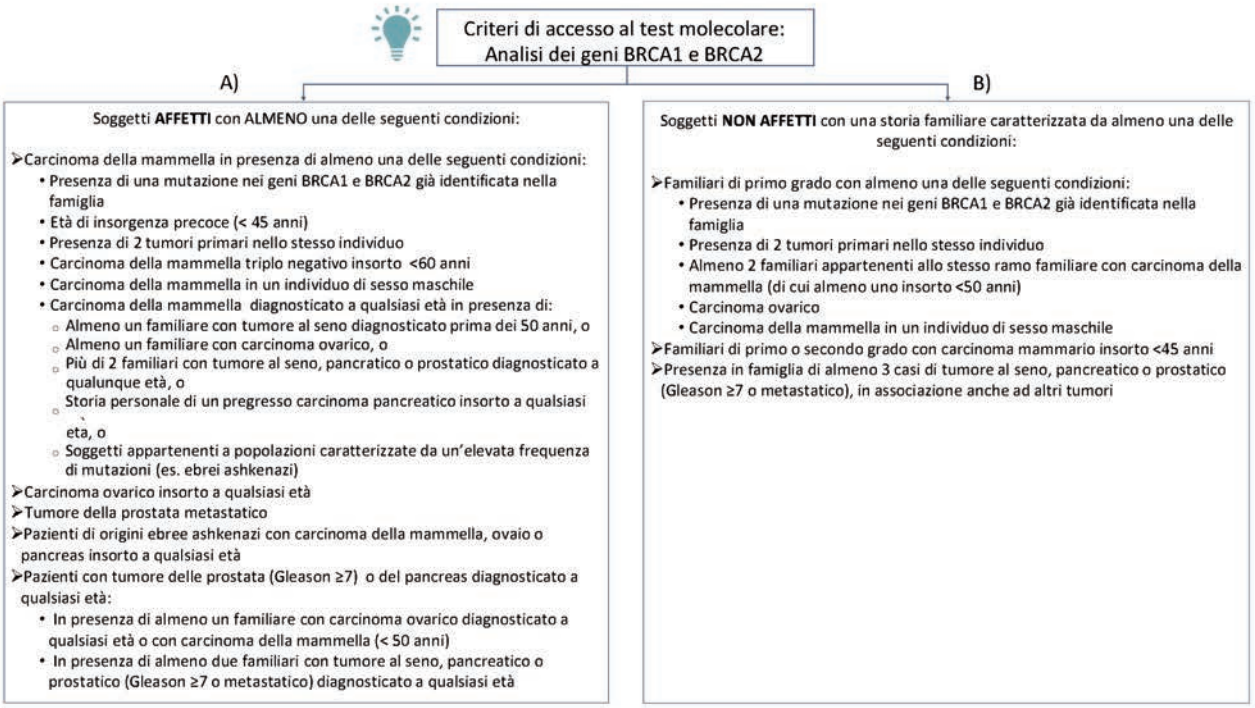


Figura 2. *Criteri di accesso all'indagine molecolare per l'analisi dei geni BRCA1 e BRCA2 in base alle linee guida del National Comprehensive Cancer Network (versione 1.2018). Il test molecolare va consigliato in presenza di specifiche caratteristiche cliniche relative all'anamnesi personale e familiare sia in presenza di pazienti affetti (A) sia in presenza di soggetti non affetti ma con una storia familiare positiva per diversi casi di tumori (B).*

penetranza dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, solo il 25% delle forme ereditarie di tumore della mammella è ascrivibile a mutazioni in questi due geni (27, 28). Ad oggi, più di 25 geni sono stati associati al tumore della mammella e/o dell'ovaio eredo-familiare e ancora tanti ci si aspetta verranno scoperti nei prossimi anni (29-31).

Quasi tutti i geni di suscettibilità per il carcinoma ereditario della mammella già noti sono geni oncosoppressori che partecipano ai processi di mantenimento della stabilità del genoma, in particolare tramite meccanismi di riparo mediante ricombinazione omologa (HRR) e di riparazione di appaiamenti errati delle basi nucleotidiche (MMR). I geni più comunemente associati alla sindrome sono *TP53, PTEN, CDH1, STK11, PALB2, ATM, CHEK2* e *BRIP1* che però spiegano solo un addizionale 3-4,5% di tutti i casi (23, 30-32).

I GENI *BRCA1* E *BRCA2*

I geni *BRCA1* e *BRCA2* sono considerati i geni maggiormente associati allo sviluppo dei tumori ereditari della mammella e dell'ovaio o HBOC (18, 33). Questi geni ad alta penetranza, sono stati scoperti approssimativamente 20 anni fa e rappresentano un obiettivo essenziale per l'individuazione dei soggetti a rischio (34). Infatti, come già discusso, mutazioni in *BRCA1* e *BRCA2* conferiscono un rischio di sviluppo di tumore nel corso della vita che va dal 40% fino anche all'85% in più rispetto alla popolazione generale (35).

BRCA1 e *BRCA2* sono due geni oncosoppressori che fanno parte dello stesso "pathway" deputato alla protezione del genoma (36, 37). Essi giocano un ruolo essenziale a differenti livelli nella risposta al danno al DNA, nella regolazione della crescita e nel differenziamento cellulare (33, 34, 37).

Il gene *BRCA1*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17, ha un ruolo cardine nel riparo del danno al DNA, nella regolazione del ciclo cellulare, nella regolazione trascrizionale e nel rimodellamento della cromatina (36). Questo gene è costituito da 24 esoni e codifica per una proteina nucleare di 1.863 aminoacidi, fondamentale per il mantenimento della stabilità del genoma (36). La proteina BRCA1 è caratterizzata da diversi domini funzionali: dalla regione carbossi-terminale si identifica il dominio RING necessario al legame con la proteina BARD1, il dominio di localizzazione nucleare (NLS), il dominio "Coiled Coil" necessario al legame con PALB2 e quindi alla dimerizzazione con BRCA2 una volta attivata, e infine il dominio BRCT essenziale per il legame con altre proteine effettrici quali Abraxas, BRIP1 e CtIP. Sulla proteina esistono, inoltre, numerosi siti di fosforilazione, target di proteine chinasi come CHEK2 e ATM, essenziali per l'attivazione di BRCA1 ed il suo successivo legame alla proteina BRCA2. La proteina BRCA1 attivata lega una serie di proteine sensori del danno che a loro volta vengono richiamate sul sito del danno dall'istone γH2AX fosforilato. Questo meccanismo dà il via ad una serie di eventi che

permettono alla cellula di bloccare il ciclo cellulare quando il DNA è danneggiato, permettendone il riparo, oppure di mandarla in apoptosi, se questo non è possibile (34).

Il gene *BRCA2*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13, è costituito da 27 esoni ed è lungo circa 70 kb. Codifica per una proteina di 3.418 aminoacidi che è il mediatore cruciale dei meccanismi di riparo del danno del DNA mediante ricombinazione omologa (38). A differenza di BRCA1, la proteina BRCA2 è in grado di legare direttamente il DNA sul sito del danno, sul quale forma un complesso con le proteine della famiglia RAD, in particolare RAD51 di cui regola direttamente l'attività. Partendo dalla regione carbossi-terminale, la proteina BRCA2 contiene un dominio di legame per PALB2, necessario al legame con BRCA1 e all'attivazione della porzione finale del "pathway" di riparo del danno al DNA, diversi domini di ripetizioni BRC utili, insieme alla porzione terminale della proteina, al legame con RAD51, il dominio di legame al DNA costituito da tre regioni di dominio di legame con gli oligonucleotidi (OB) e da un dominio a torre (T), i quali permettono di legare il DNA sia a singolo che a doppio filamento e, infine, il dominio di localizzazione nucleare NLS (34).

I soggetti portatori di mutazioni germinali nei geni *BRCA1/2* hanno una maggiore predisposizione allo sviluppo di tumori poiché i meccanismi di riparo del danno garantiti dalle proteine da essi codificate sono alterati, comportando modifiche ai processi di crescita e proliferazione e, più in generale, perdita dei comuni meccanismi di controllo del ciclo cellulare (39). L'inattivazione dei geni *BRCA* causa, inoltre, alterazioni strutturali e aberrazioni cromosomiche determinando le aneuploide tipiche dei tessuti tumorali.

Le mutazioni germinali nei geni *BRCA1* e *BRCA2* vengono trasmesse con meccanismo autosomico dominante a penetranza incompleta, per cui ogni soggetto portatore ha il 50% di probabilità di trasmetterlo ai figli. Alcune popolazioni come gli ebrei ashkenaziti ed altri isolati genici sono da considerarsi ancora più a rischio per questa patologia, probabilmente a causa di un effetto fondatore che ha fissato nella popolazione specifiche mutazioni (40).

Ad oggi, sono state riscontrate oltre 3.000 varianti di sequenza nei geni *BRCA1/2* che includono piccole delezioni e inserzioni ma soprattutto singole sostituzioni nucleotidiche (36, 37). Nonostante le mutazioni patogenetiche nei geni *BRCA1* e *BRCA2* siano riscontrate con maggiore frequenza rispettivamente nell'esone 20 e negli esoni 10 e 11, non sono riportati "hot spot" mutazionali specifici per entrambi i geni. Le mutazioni patogenetiche dei geni *BRCA1/2* comportano, generalmente, l'alterazione della cornice di lettura, formazione di codoni di stop prematuri e formazione di proteine tronche e/o non funzionali (singole sostituzioni nucleotidiche possono alterare i siti di legame con uno specifico interattore). Alcune mutazioni sono più frequenti in specifiche popolazioni rispetto ad altre, proprio a causa dell'effetto fondatore descritto in precedenza. Inoltre, *BRCA1* rispetto a *BRCA2* ha il più alto grado di duplicazioni e delezioni (42% rispetto al 20%) a causa delle sequenze ripetute dette ALU. I grandi riarrangiamenti genomici (LGRs) comprendono circa 1/3 delle mutazioni di *BRCA1* e sono tipicamente il risultato della ricombinazione omologa tra *BRCA1* ed il suo pseudogene (41).

LA DIAGNOSI MOLECOLARE DEI TUMORI EREDITARI DELLA MAMMELLA

A partire dagli anni '90, dopo il sequenziamento dell'intero genoma umano, sono stati fatti notevoli passi avanti nella scoperta dei geni causativi associati a numerose patologie ereditarie. Questo ha portato allo sviluppo di test, sempre più sensibili ed accurati, per l'analisi di specifici geni-malattia al fine di identificare le mutazioni associate ad un determinato fenotipo o di individuare le persone a rischio. Lo sviluppo tecnologico che ha caratterizzato gli ultimi dieci anni ha dato notevole impulso anche al settore della diagnostica molecolare. In particolare, la diffusione ed il consolidamento delle tecniche NGS ha permesso di sviluppare e validare nuovi approcci per lo studio delle basi molecolari di patologie umane ereditarie ed acquisite, inclusi i tumori ereditari della mammella (42-46). Le indagini molecolari, infatti, permettono di individuare portatori di mutazioni patogenetiche prima della manifestazione del fenotipo-malattia e, quindi, di definire misure preventive e procedimenti terapeutici tali, in molti casi, da evitare l'insorgenza della patologia.

Uno dei primi test genetici a essersi diffuso su ampia scala nella maggioranza dei paesi è lo screening dei geni *BRCA1* e *BRCA2* (37). Oggi, le metodiche di NGS permettono l'analisi simultanea di pannelli di geni e rendono quindi possibile, attraverso il sequenziamento anche dei geni a bassa e media penetranza, aumentare la sensibilità diagnostica dell'indagine molecolare (44-46).

TECNICHE DI ANALISI DEI GENI *BRCA1/2*

Nel corso degli anni, numerose tecniche sono state utilizzate per l'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2* (38). In passato, sono state utilizzate metodiche, come l'analisi dei polimorfismi di conformazione a singolo filamento (SSCP), l'analisi mediante endonucleasi di restrizione (REF-SSCP), l'analisi mediante gel elettroforesi conformazione-sensibile (CSGE) e la stessa mediante fluorescenza (F-CSGE), il test della proteina tronca (PTT) e la cromatografia liquida in condizioni denaturanti ad alta prestazione (dHPLC) (46, 47), generalmente seguite dal sequenziamento diretto. Il sequenziamento diretto del DNA attraverso il metodo di Sanger è stato considerato per anni il "gold standard" per l'individuazione di mutazioni puntiformi. Si tratta, tuttavia, di un procedimento lento e costoso, soprattutto quando si analizzano geni di grosse dimensioni come *BRCA1/2*. Per tali motivi, le tecniche di NGS si stanno diffondendo rapidamente sostituendo le precedenti metodiche (43-48).

Lo screening molecolare mediante NGS dei geni *BRCA1/2* consente di ottenere risultati precisi in tempi rapidi, utili spesso a fornire informazioni necessarie per la diagnosi differenziale e per la somministrazione di specifiche terapie (48). Le tecniche di NGS permettono di individuare principalmente mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzioni. Inoltre, attraverso l'utilizzo di specifici software di analisi bioinformatica, che sono in grado di effettuare un'analisi quantitativa delle sequenze ottenute per ciascuna regione genica sequenziata, è possibile anche effettuare una predizione relativa alla presenza di LGRs (49-51). Eventuali alterazioni devono essere confermate utilizzando metodiche specifiche per l'identificazione di macro-delezioni e macro-duplicazioni come la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) o, per difetti genomici di dimensioni maggiori, l'analisi genomica comparativa (CGH) e l'ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti (FISH).

Pertanto, l'introduzione di tecniche di NGS nelle pratiche di biologia molecolare clinica per l'analisi dell'intera regione codificante e delle regioni regolatorie dei geni *BRCA1/2* rappresenta l'elemento cardine per una diagnostica di nuova generazione, basata sull'estrema riproducibilità e standardizzazione, velocità e facilità di esecuzione e, con lo sviluppo di software sempre più all'avanguardia, anche di analisi per l'identificazione di diverse tipologie di mutazioni, inclusi i LGRs.

OLTRE *BRCA1* E *BRCA2*: ANALISI DI AMPI PANNELLI DI GENI

I geni *BRCA1* e *BRCA2* sono i due geni maggiormente associati, ad oggi, ad un aumentato rischio di sviluppare il tumore ereditario della mammella e dell'ovaio. Tuttavia, un numero elevato di pazienti con una storia personale e/o familiare suggestiva di una neoplasia ereditaria sono negativi allo screening di questi due geni, suggerendo che altri fattori genetici potrebbero essere coinvolti.

Negli ultimi anni, la rapida ascesa delle tecniche di NGS ha permesso l'identificazione di moltissimi altri geni associati allo sviluppo dei tumori ereditari della mammella (18, 52, 53). Secondo le linee guida del NCCN, l'analisi mediante ampi pannelli di geni costituisce una valida possibilità da prendere in considerazione quando più di un gene potrebbe essere responsabile del fenotipo presente nella famiglia data l'eterogeneità delle tipologie di tumore presenti (26). La sensibilità diagnostica di questo tipo di analisi molecolare si è dimostrata molto elevata (dal 36 al 61% di mutazioni riscontrate nei soggetti affetti) dimostrando l'efficacia dell'analisi di pannelli di geni come test di secondo livello per migliorare la gestione del rischio in pazienti negativi per mutazioni nei geni BRCA (54-62).

I pannelli di geni, dunque, stanno aprendo nuovi orizzonti nell'ambito della diagnostica dei tumori eredo-familiari. Tale tipo di indagine molecolare, infatti, non solo contribuisce ad incrementare la sensibilità dei test ad oggi disponibili, ma rappresenta anche uno strumento fondamentale per la diagnosi differenziale delle varie forme di tumori eredo-familiari ponendo le basi per la determinazione di procedimenti clinici, terapeutici e chirurgici studiati in maniera personalizzata sulla base del genotipo del paziente.

Nonostante il sequenziamento mirato di un ampio numero di geni si stia rapidamente diffondendo, anche grazie alla progressiva riduzione dei costi ed al simultaneo aumento della riproducibilità analitica, esso tuttavia introduce nuove sfide che aumentano in maniera proporzionale all'aumentare del numero di geni analizzati (43, 44). Prima di tutto è necessario valutare in che percentuale la mutazione riscontrata possa contribuire al fenotipo-malattia presente nel paziente e quanto essa sia determinante nella gestione del rischio genetico nei suoi familiari. In secondo luogo, all'aumentare del numero di geni analizzati aumenta notevolmente anche la quantità di varianti dal significato clinicamente incerto (VUS) o non riportate nei database che vengono identificate e che rendono complessa l'interpretazione del dato di laboratorio nel contesto clinico. Quindi, il beneficio e l'utilità dei pannelli multi-genici nella pratica clinica dipende prima di tutto dalla scelta appropriata dei pazienti da sottoporre all'indagine (che devono avere criteri di inclusione molto stringenti e non semplicemente essere negativi allo screening di di primo livello) e poi dai geni da analizzare per i quali è necessario che siano state riscontrate varianti il cui rischio è chiaramente determinabile e non portino a risultati non rilevanti ai fini della gestione dei pazienti e dei loro familiari (63). Queste problematiche sono trasversali e comuni a tutte le tipologie di pannelli di geni, indipendentemente dalla patologia studiata. Inoltre, la produzione di grandi quantità di dati di sequenza, per singola seduta analitica, impone importanti sfide relative alla gestione, conservazione e condivisione dei dati (i "big data") nel rispetto della normativa della privacy che necessitano ancora oggi di una notevole standardizzazione e di regolamenti specifici (44).

Recentemente, le linee guida del NCCN hanno incluso i geni non-BRCA all'interno delle pratiche cliniche per la gestione delle pazienti HBOC. In particolare, le pazienti portatrici di mutazioni nei geni *ATM*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1* e *PALB2* vengono definite ad alto rischio quanto le portatrici di mutazioni nei geni *BRCA1/2* con conseguente indicazione a sottoporsi ad approfonditi programmi di screening diagnostico-strumentali (26). Inoltre, in presenza di mutazioni nei geni *BRIP1*, *RAD51C* e *RAD51D* si raccomandano procedure preventive di ovariectomia prima dei 45-50 anni per ridurre il rischio di tumore ovarico nelle donne portatrici (27, 64).

CONCLUSIONI

I tumori ereditari della mammella rappresentano un gruppo di carcinomi con specifiche caratteristiche prognostiche: l'identificazione precoce dei portatori di mutazioni patogenetiche, associate ad un aumentato rischio di sviluppare il tumore della mammella e altre

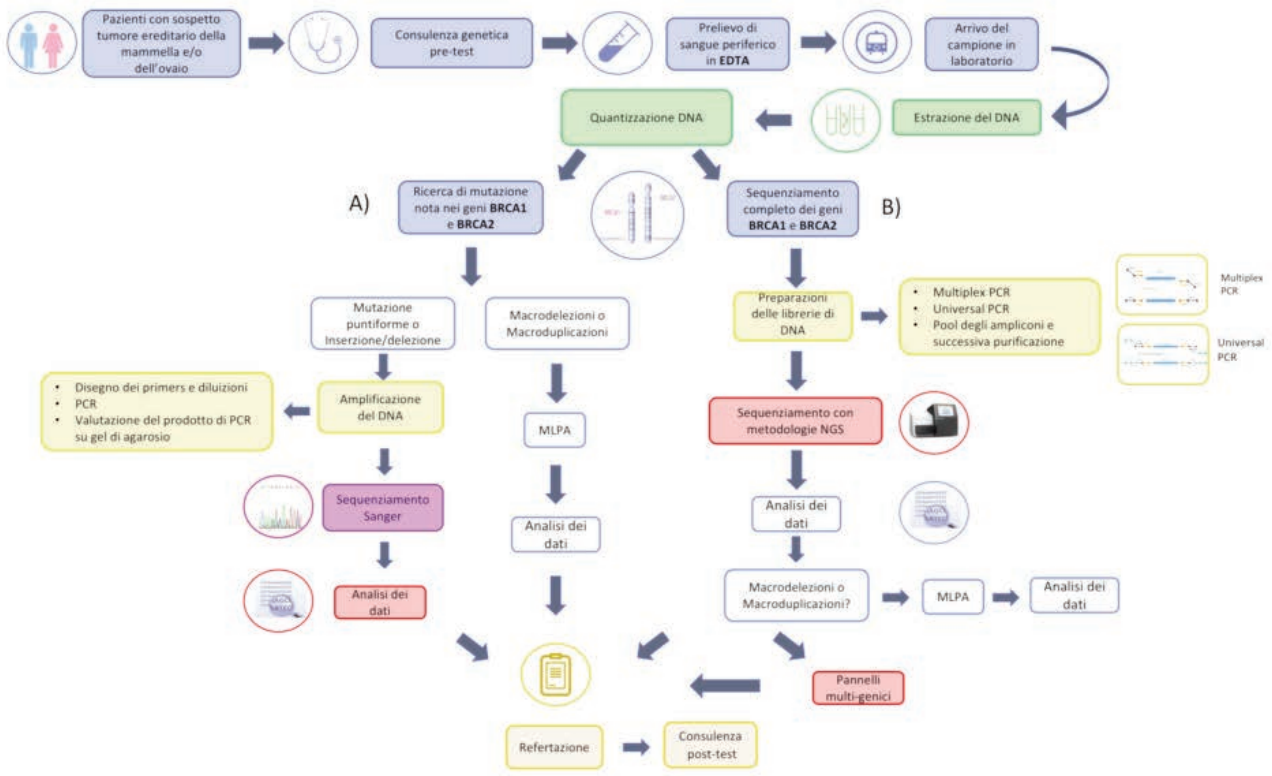


Figura 3. *Percorso diagnostico per l'identificazione dei pazienti a rischio di sviluppare un tumore ereditario della mammella. A) Ricerca di mutazioni già note nei geni BRCA1 e BRCA2 e B) sequenziamento completo dei due geni. La prima fase è comune ad entrambe le procedure diagnostiche e prevede l'identificazione dei pazienti a rischio, il prelievo di sangue, l'accettazione e l'estrazione del DNA. La seconda fase, invece, prevede l'impiego di metodiche differenti finalizzate o all'identificazione di una mutazione già nota nella famiglia (mutazione puntiforme o LGR) o allo screening completo dei geni BRCA1 e BRCA2. Al termine della fase analitica si procede con la fase di refertazione e comunicazione dei risultati mediante una consulenza post-test, preferibilmente effettuata da un gruppo multidisciplinare.*

neoplasie, è di fondamentale importanza per l'attuazione, nei pazienti affetti, di efficaci strategie terapeutiche e/o preventive (recidive e/o nuovi tumori primari). L'estensione dell'indagine molecolare ai familiari non affetti, inoltre, permette di individuare le persone ad alto rischio e di proporre percorsi preventivi personalizzati in base a sesso, età e alla presenza di altri concomitanti ed indipendenti fattori di rischio. Ne consegue che diventa essenziale disporre di test di diagnostica molecolare caratterizzati da elevata sensibilità ed accuratezza e che possano essere inclusi nel percorso diagnostico/assistenziale dei pazienti oncologici e dei loro familiari (Figura 3, A e B).

La crescita della domanda in ambito clinico, ha permesso all'NGS di diventare rapidamente e in modo efficiente la strategia di elezione per l'identificazione di varianti geniche associate a differenti patologie, inclusi i tumori ereditari (43, 44, 48, 65, 66). L'analisi dei geni *BRCA1* e *BRCA2* mediante sequenziamento con metodiche di NGS si è dimostrata un approccio efficace non solo per l'individuazione di varianti puntiformi ma anche per l'identificazione di LGRs (49-51, 67, 68). Inoltre, l'analisi di pannelli di geni, che permette una migliore caratterizzazione molecolare dei pazienti, migliora la sensibilità diagnostica dell'indagine molecolare stessa. L'ulteriore standardizzazione dei protocolli molecolari e delle metodiche di analisi bioinformatica, unitamente alla corretta interpretazione clinica delle varianti identificate, porteranno ad una crescente diffusione di tali metodiche nella routine diagnostica al fine di supportare la diagnosi, il monitoraggio e la terapia dei soggetti affetti, e di quelli a rischio di sviluppare tumori ereditari della mammella e/o dell'ovaio.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. http://www.globocan.iarc.fr (ultimo accesso: luglio 2018).
2. Pollán M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. J Natl Cancer Inst 2009;101:1584-91.
3. DeSantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast Cancer Statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2014;64:52-62.
4. Trewin CB, Strand BH, Weedon-Fekjær H, et al. Changing patterns of breast cancer incidence and mortality by education level over four decades in Norway, 1971-2009. Eur J Public Health 2017;27:160-6.
5. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res 2004;6:229-39.
6. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends - an update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2016;25:16-27.
7. http:// www.istat.it (ultimo accesso: luglio 2018).
8. http://www.aiom.it (ultimo accesso: luglio 2018).
9. http://www.cancerresearchuk.org (ultimo accesso: luglio 2018).
10. Kobayashi S, Sugiura H, Ando Y, et al. Reproductive history and breast cancer risk. Breast Cancer 2012;19:302-8.
11. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, et al. "Hormonal" risk factors, "breast tissue age" and the age-incidence of breast cancer. Nature 1983;303:767-70.
12. Breyer JZ, Wendland EM, Kops NL, et al. Assessment of potential risk factors for breast cancer in a population in Southern Brazil. Breast Cancer Res Treat 2018;169:125-31.
13. Rudolph A, Song M, Brook MN, et al. Joint associations of a polygenic risk score and environmental risk factors for breast cancer in the Breast Cancer Association Consortium. Int J Epidemiol 2018;47:526-36.
14. Dierssen-Sotos T, Palazuelos-Calderón C, Jiménez-Moleón JJ, et al. Reproductive risk factors in breast cancer and genetic hormonal pathways: A gene-environment interaction in the MCC-Spain project. BMC Cancer 2018;18:280.
15. Lasky-Su JA, Zeleznik OA, Eliassen AH. Using metabolomics to explore the role of postmenopausal adiposity in breast cancer risk. J Natl Cancer Inst 2018;110:2017-8.
16. Heitz AE, Baumgartner RN, Baumgartner KB, et al. Healthy lifestyle impact on breast cancer-specific and all-cause mortality. Breast Cancer Res Treat 2018;167:171-81.
17. Yamashita H. Hereditary breast cancer: molecular biology and management update. Int J Clin Oncol 2018;23:35.
18. Melchor L, Benítez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. Hum Genet 2013;132.845-63.
19. Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA, et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. Jama 1995: 273:577-85.
20. Li N, Rowley SM, Thompson ER, et al. Evaluating the breast cancer predisposition role of rare variants in genes associated with low-penetrance breast cancer risk SNPs. Breast Cancer Res 2018;20:3.
21. Aftimos PG, Barthelemy P, Awada A. Molecular biology in medical oncology: diagnosis, prognosis, and precision medicine. Discov Med 2014;17:81-91.
22. Müllauer L. Milestones in pathology - from histology to molecular biology. Memo 2017;10:42-5.
23. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. Nat Rev Cancer 2016;16:599-612.
24. https://www.cancer.net (ultimo accesso: luglio 2018).
25. Alemar B, Gregório C, Herzog J, et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? PLoS One 2017;12:e0187630.
26. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, et al. Breast Cancer, Version 4.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2018;16:310-20.
27. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. Hum Genet 2008;124:31-42.
28. Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108:18032-7.
29. Rosenthal ET, Bernhisel R, Brown K, et al. Clinical testing with a panel of 25 genes associated with increased cancer risk results in a significant increase in clinically significant findings across a broad range of cancer histories. Cancer Genet 2017;218-219:58-68.
30. Sung PL, Wen KC, Chen YJ, et al. The frequency of cancer predisposition gene mutations in hereditary breast and ovarian cancer patients in Taiwan: From BRCA1/2 to multi-gene panels. PLoS One 2017;12:e0185615.
31. Määttä K, Rantapero T, Lindström A, et al. Whole-exome sequencing of Finnish hereditary breast cancer families. Eur J Hum Genet 2016;25:85-93.
32. Pinto P, Paulo P, Santos C, et al. Implementation of next-generation sequencing for molecular diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer highlights its genetic heterogeneity. Breast Cancer Res Treat 2016;159:24556.
33. Grimmett C, Pickett K, Shepherd J, et al. Systematic review of the empirical investigation of resources to support decision-making regarding BRCA1 and BRCA2 genetic testing in women with breast cancer. Patient Educ Couns 2018;101:779-88.
34. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. Nat Rev Cancer 2011;12:68-78.
35. Rousset-Jablonski C, Gompel A. Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. Maturitas 2017;105:69-77.
36. Sharma B, Preet Kaur R, Raut S, et al. BRCA1 mutation spectrum, functions, and therapeutic strategies: The story so far. Curr Probl Cancer 2018. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.01.001.
37. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. Nat Rev Clin Oncol 2010;7:702-7.
38. Jensen RB. BRCA2: one small step for DNA repair, one giant protein purified. Yale J Biol Med 2013;86:479-89.
39. Narod SA. Breast cancer in young women. Nat Rev Clin Oncol 2012;9:460-70.
40. Jatoi I, Anderson WF. Management of women who have a genetic predisposition for breast cancer. Surg Clin North Am 2008;88:845-61.
41. Zhang J, Fackenthal JD, Huo D, et al. Searching for large genomic rearrangements of the BRCA1 gene in a Nigerian population. Breast Cancer Res Treat 2010;124:573-7.
42. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 2010;11:31-46.
43. Precone V, Del Monaco V, Esposito MV, et al. Cracking the code of human diseases using next-generation sequencing: applications, challenges and perspectives.

Biomed Res Int 2015;2015:161648.
44. D'Argenio V. The high-throughput analyses era: are we ready for the data struggle? High Throughput 2018;7(1).
45. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. PLoS One. 2013;8:e55681.
46. Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B, et al. Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review. Eur J Hum Genet 2007;15:619-27.
47. Somasundaram K. BRCA1 and BRCA1 genes and inherited breast and/or ovarian cancer: benefits of genetic testing. Indian J Surg Oncol 2010;1:245-9.
48. D'Argenio V, Esposito MV, Telese A, et al. The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: Next-generation sequencing supersedes conventional approaches. Clin Chim Acta 2015;446:221-5.
49. Nunziato M, Starnone F, Lombardo B, et al. Fast detection of a BRCA2 large genomic duplication by next generation sequencing as a single procedure: a case report. Int J Mol Sci 2017;18(11).
50. Concolino P, Rizza R, Mignone F, et al. A comprehensive BRCA1/2 NGS pipeline for an immediate Copy Number Variation (CNV) detection in breast and ovarian cancer molecular diagnosis. Clin Chim Acta 2018;480:173-9.
51. Scaglione GL, Concolino P, De Bonis M, et al. A whole germline BRCA2 gene deletion: how to learn from CNV in silico analysis. Int J Mol Sci 2018;19(4).
52. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. Oncotarget 2017;8:47064-47075.
53. Elsayegh N, Webster RD, Gutierrez Barrera AM, et al. Contralateral prophylactic mastectomy rate and predictive factors among patients with breast cancer who underwent multigene panel testing for hereditary cancer. Cancer Med 2018. doi: 10.1002/cam4.1519.
54. Lincoln SE, Kobayashi Y, Anderson MJ, et al. A systematic comparison of traditional and multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer genes in more than 1000 patients. J Mol Diagn 2015;17:533-44.
55. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, et al. Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. JAMA Oncol 2015;1:943-51.
56. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. Cancer 2017;123:1721-30.
57. Eliade M, Skrzypski J, Baurand A, et al. The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: what are the implications for the management of patients and families? Oncotarget 2017;8:1957-71.
58. Castéra L, Krieger S, Rousselin A, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. Eur J Hum Genet 2014;22:1305-13.
59. Tung N, Lin NU, Kidd J, et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. J Clin Oncol 2016;34:1460-8.
60. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. JAMA Oncol 2017;3:1190-6.
61. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. Genet Med 2016;18:823-32.
62. Shirts BH, Casadei S, Jacobson AL, et al. Improving performance of multigene panels for genomic analysis of cancer predisposition. Genet Med 2016;18:1-8.
63. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. N Engl J Med 2015;372:2243-57.
64. Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. Cancer Cell 2007;11:103-5.
65. D'Argenio V, Frisso G, Precone V, et al. DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. J Mol Diagn 2014;16:32-44.
66. Bergougnoux A, D'Argenio V, Sollfrank S, et al. Multicenter validation study for the certification of a CFTR gene scanning method using next generation sequencing technology. Clin Chem Lab Med 2018;56:1046-53.
67. D'Argenio V, Esposito MV, Gilder JA, et al. Should a BRCA2 stop codon human variant, usually considered a polymorphism, be classified as a predisposing mutation? Cancer 2014;120:1594-5.
68. Esposito MV, Nunziato M, Starnone F, et al. A novel pathogenic brca1 splicing variant produces partial intron retention in the mature messenger RNA. Int J Mol Sci 2016;17(12).

Un nuovo ruolo del *CYP2R1* nella sclerosi multipla

Luisa Agnello[1], Concetta Scazzone[1], Paolo Ragonese[2], Giulia Bivona[1], Bruna Lo Sasso[1], Salvatore Milano[3], Giuseppe Salemi[2], Chiara Bellia[1], Marcello Ciaccio[1,3]

[1]Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo

[2]Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche, Università degli Studi di Palermo

[3]Unità Operativa Complessa di Medicina di Laboratorio-CoreLab, Policlinico "P. Giaccone", Palermo

ABSTRACT

A new role of *CYP2R1* in multiple sclerosis. Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative autoimmune disease resulting from a complex interaction of genetic and environmental factors. Among these, vitamin D and genetic variants associated with vitamin D metabolism have gained great attention. The aim of our study was to assess two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CYP2R1* in relation to serum 25-OH-vitamin D_3 levels in MS patients and healthy controls. 25-OH-vitamin D_3 serum concentrations and genotyping of *CYP2R1*-SNPs gene were analysed both in MS patients and in healthy controls. In particular, rs10741657 and rs10766197 of *CYP2R1* gene were assessed by real-time allelic discrimination Taq-Man assay (Applied Biosystems, Forster City, USA); 25-OH-vitamin D_3 serum concentration was measured by a high-performance liquid chromatography (HPLC) method. Statistical analysis was performed by a SPSS software (version 13.0). The analysis of the obtained results showed lower 25-OH-vitamin D_3 concentrations in MS patients than in controls. When comparing genotype distribution and allele frequencies of the two selected SNPs between cases and controls, significant differences were observed only for *CYP2R1* rs10766197. Minor allele of *CYP2R1* rs10766197 (A) was significantly represented in MS patients, demonstrating an association of allele A to MS. Analysis of the *CYP2R1* rs10766197 distribution in MS patients showed that patients carrying the genotype AA had a trend of lower levels of 25-OH-vitamin D_3 in comparison to those with genotype GG or GA, although not statistically significant. Moreover, after stratifying MS patients according to gender, we found that the minor allele A of rs10766197 in homozygosis was associated with disease progression, assessed by Expanded Disability Status Scale and Multiple Sclerosis Severity Score scores, only in men. Our study demonstrates a role of *CYP2R1* in both risk and progression of MS, with sex-related differences.

INTRODUZIONE

La vitamina D è un ormone steroideo liposolubile con un ruolo critico nell'omeostasi fosfocalcica, nella proliferazione e nel differenziamento cellulare, e nell'immunomodulazione. Una sua carenza è associata a un maggiore rischio di sviluppare patologie ossee, quali il rachitismo, l'osteomalacia e l'osteoporosi; inoltre, negli ultimi anni è emerso che l'ipovitaminosi D è associata a disturbi non scheletrici, quali malattie cardiovascolari, autoimmuni ed alcune neoplasie. Nell'ambito delle malattie autoimmuni, è stato descritto in letteratura, fin dal 1974, un ruolo protettivo della vitamina D sul rischio di sviluppare sclerosi multipla (SM) (1).

La SM è una malattia neurodegenerativa cronica del sistema nervoso centrale (SNC) in cui una complessa interazione tra infiammazione, demielinizzazione e danno neuro-assonale porta alla disabilità clinica. I pazienti presentano un decorso variabile della malattia la cui progressione può essere valutata mediante varie scale cliniche, tra cui le più comunemente utilizzate sono la "Expanded Disability Status Scale" (EDSS) e la "Multiple Sclerosis Severity Score" (MSSS).

Generalmente, i pazienti con SM presentano basse concentrazioni sieriche di vitamina D. Inoltre, studi *in vivo* su modelli murini di encefalomielite autoimmune, che rappresenta il miglior modello sperimentale di SM, e analisi *in vitro* su pazienti con SM hanno rilevato un effetto immunomodulatore della vitamina D (2,3). Infine, da studi murini è emerso un ruolo della vitamina D nel processo di de/re-mielinizzazione (4). Queste evidenze

Corrispondenza a: Luisa Agnello, Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo, e-mail: luisa.agnello@gmail.com

Ricevuto: 08.03.2018 Revisionato: 28.05.2018 Accettato: 01.06.2018

Pubblicato on-line: 11.10.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.060

supportano un possibile effetto patogenetico dell'ipovitaminosi D nel rischio di sviluppare SM. Infatti, in presenza di ridotte concentrazioni di vitamina D, vengono meno sia il ruolo neuroprotettivo che di regolazione della risposta immunitaria, favorendo così l'insorgenza della malattia.

Nell'uomo, la vitamina D è principalmente sintetizzata nella cute in seguito a esposizione alle radiazioni solari ultraviolette (UV) e solo il 10% deriva dalla dieta perché comunemente gli alimenti naturali contengono solo tracce di vitamina D (5); la vitamina D può, tuttavia, essere assunta tramite integratori, compresse multivitaminiche o prodotti alimentari fortificati.

È nota in letteratura una variabilità interindividuale nello status di vitamina D, di cui circa il 25% può essere spiegato da fattori, quali l'esposizione alla luce solare e l'assunzione di vitamina D, ma il contributo più significativo (23-80%) sembrerebbe derivare da fattori genetici, come suggerito da studi su gemelli e familiari (6, 7). Nell'ultimo decennio, "Genome Wide Association Studies" (GWAS) e un numero crescente di studi su geni candidati hanno rivelato un'associazione tra varianti nei geni che codificano per fattori coinvolti nella sintesi, nel metabolismo e nel trasporto della vitamina D e l'ipovitaminosi D.

Il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente valutato l'influenza di varianti nei geni che codificano per il recettore della vitamina D (VDR), il "group-specific component" (GC) e il citocromo P450 27B1 (CYP27B1) sui livelli di vitamina D in pazienti con SM (8, 9). Recentemente, due GWAS condotti su soggetti di origine europea hanno identificato, indipendentemente, varianti nel gene *CYP2R1* associate a più bassi livelli di vitamina D (10, 11).

Il CYP2R1 appartiene alla famiglia del citocromo P450 ed è uno dei principali enzimi a monte della via metabolica della vitamina D. Sebbene sia noto che i citocromi hanno un ruolo importante nei processi di ossidazione/riduzione, partecipando all'eliminazione dei composti tossici a livello epatico (12), oggi è ampiamente documentato che sono coinvolti anche nel metabolismo della vitamina D. In particolare, il CYP2R1 è un enzima che catalizza l'idrossilazione epatica della vitamina D_3 in posizione 25-C per formare la 25-OH-vitamina D_3 (25-OH-D_3), nota come calcidiolo, che rappresenta la forma più abbondante di vitamina D circolante, in quanto riflette sia il contributo cutaneo che alimentare, ed è considerato un affidabile indicatore dello status di vitamina D.

Scopo del nostro studio è valutare l'associazione tra polimorfismi del gene che codifica per l'enzima CYP2R1 (rs10766197 e rs10741657), le concentrazioni plasmatiche di 25-OH-D_3 e SM, in pazienti affetti dalla malattia e in una popolazione controllo.

MATERIALI E METODI

Pazienti e controlli

Questo studio caso-controllo retrospettivo ha incluso un totale di 265 soggetti provenienti dalla Sicilia occidentale, di cui 105 pazienti con SM (casi) e 160 soggetti sani (controlli). I casi sono stati reclutati da giugno a dicembre 2014, presso il dipartimento di Neurologia, Policlinico P. Giaccone, Università degli Studi di Palermo. I controlli sono rappresentati da donatori di sangue selezionati per età, sesso ed etnia, reclutati da aprile 2015 a luglio 2016, presso l'unità di Medicina Trasfusionale dell'Ospedale Villa Sofia-Cervello di Palermo. Il comitato etico locale ha approvato il protocollo e tutti i soggetti hanno partecipato allo studio previo consenso informato. La diagnosi di SM è stata posta da un neurologo esperto e basata su una precedente storia di malattia, esame fisico, analisi del liquido cerebrospinale e risonanza magnetica secondo i criteri di McDonald modificati (13). Lo stato neurologico dei pazienti è stato valutato usando la scala EDSS. La progressione della disabilità è stata valutata usando la scala MSSS (14). Il tasso di recidive annualizzato "Annualized Recidive Rate" (ARR), è stato calcolato nell'anno precedente la genotipizzazione.

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti inclusi nello studio.

Analisi biochimica

Il siero per l'analisi biochimica è stato ottenuto da campioni di sangue intero prelevati in provetta senza addittivi. Ogni campione è stato centrifugato e il siero ottenuto è stato immediatamente processato per il dosaggio della 25-OH-D_3. In particolare, la concentrazione sierica di 25-OH-D_3 è stata misurata mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), utilizzando il kit di reazione Chromosystem "Chromsystems Instruments and Chemicals" e un sistema cromatografico dotato di pompa Waters 1525 Binary HPLC. La separazione cromatografica è stata condotta come segue: colonna analitica C18, temperatura della colona 25°C, tasso di flusso 0,7 mL/minuto, lunghezza d'onda 265 nm e volume d'iniezione del campione 50 µL. La separazione cromatografica è stata eseguita con eluizione isocratica con tempo di ritenzione di 4,2 minuti. In accordo con le indicazioni del produttore, si definisce grave carenza di 25-OH-D_3 quando i livelli sierici sono inferiori a 15 µg/L, insufficienza per livelli compresi tra 20 e 30 µg/L, e sufficienza per livelli superiori a 30 µg/L.

Analisi molecolare

Il DNA di ciascun soggetto incluso nello studio è stato estratto da un'aliquota di 200 µL di sangue intero prelevato in EDTA, utilizzando un kit commerciale di estrazione (Qiagen), e conservato a -80 °C fino all'analisi. La qualità del DNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8% e successiva quantificazione allo spettrofotometro. L'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide ("Single Nucleotide Polymorphisms", SNPs) è stata condotta utilizzando la tecnologia Taq-man su real-time PCR 7500 (Applied Biosystems). Le caratteristiche delle varianti genetiche

Tabella 1
Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti e dei controlli

	Pazienti (n=105)	Controlli (n=160)
Età (anni)	39 (9,9)	45 (9,6)*
Sesso, n (maschi/femmine)	25/80	84/76
Durata della malattia (anni)	10,6 [2,4 – 20,1]	-
Età di esordio di SM	28,0 (7,9)	-
Tipo di SM (n): RR/SP/PP	90/14/1	-
EDSS	2 [1-5]	-
MSSS	3,2 [1,4 – 5,4]	-
ARR	1 [1-2]	.
25-OH-D3 (µg/L)	21,8 (7,2)	38,1 (8,2)*

I dati sono espressi come media (DS) o mediana [range interquartile]

**P <0,0001*

SM, sclerosi multipla; RR, recidivante-remittente; SP, secondariamente progressiva; PP, primariamente progressiva;

EDSS, expanded disability status scale; MSSS, multiple sclerosis severity score; ARR, annualized relapse rates

analizzate sono riportate nella Tabella 2. Le condizioni utilizzate per la PCR sono state: 60 °C per 30 secondi, 95 °C per 10 minuti; in seguito 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 30 secondi, infine uno step a 60 °C per 30 secondi. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 20 µL (1 µl di DNA, 10 µL di TaqMan Genotyping Master Mix, 8,5 µL di acqua, 0,5 µL di Assay).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software SPSS (versione 13.0). Per l'analisi di associazione genetica, tutti i genotipi sono stati valutati per l'equilibrio di Hardy-Weinberg utilizzando il test del chi-quadro. Le frequenze alleliche e genotipiche degli SNPs sono state confrontate mediante il test esatto di Fisher. Le variabili continue sono state espresse come mediana e range interquartile o media (DS), quando appropriato. Il confronto tra le variabili continue è stato effettuato mediante il test di Mann-Whitney. Il confronto dei valori di 25-OH-D_3 tra le tre classi genotipiche è stato effettuato mediante test ANOVA. Un valore di P <0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Determinazione di 25-OH-D_3

I livelli medi circolanti di 25-OH-D_3 sono risultati significativamente più bassi nei pazienti con SM rispetto ai controlli, i quali avevano tutti livelli sufficienti di 25-OH-D_3 (38,1±8,2µg/L vs 21,8±7,2µg/L, rispettivamente; P <0,001). Nei pazienti con SM era prevalente (58%) l'insufficienza di 25-OH-D_3, il 26% presentava carenza e solo il 15% sufficienza.

Stratificando i pazienti con SM in base al sesso e all'età, abbiamo trovato livelli di 25-OH-D_3 leggermente ridotti negli uomini rispetto alle donne (20,1 ± 6,2 µg/L vs 22,3 ± 7,3 µg/L, rispettivamente; P=0,15) e nessuna differenza statisticamente significativa legata all'età.

Analisi molecolare

La distribuzione genotipica degli SNPs del gene *CYP2R1* era in equilibro di Hardy Weinberg. Dall'analisi della distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche dei due SNPs, è emersa una differenza statisticamente significativa solo per il polimorfismo rs10766197 (Tabella 3). L'analisi della distribuzione del rs10766197 in base alla concentrazione di 25-OH-D_3 ha rivelato che i pazienti portatori del genotipo AA presentavano livelli più bassi di 25-OH-D_3 rispetto ai pazienti con genotipo GG o GA, sebbene non statisticamente significativi: GG 22,3±6,8 µg/L, GA 22,2±8 µg/L e AA 19,2±4,3 µg/L (P=0,08). Inoltre, l'analisi dell'effetto del rs10766197 su età di insorgenza della malattia, EDSS, MSSS e ARR non ha rivelato alcun effetto dello SNP sul decorso della malattia. Tuttavia, prendendo in considerazione le differenze legate al sesso, è emerso che i pazienti di sesso maschile portatori dell'allele A in omozigosi (AA) presentavano un decorso della malattia più grave rispetto ai pazienti di sesso femminile con genotipo AA (EDSS=4 [IQR 2-6] e 2 [1-4], rispettivamente in maschi e femmine; P=0,02. MSSS=4,9 [IQR 2,7-8] e 2,9 [0,8-5,4], rispettivamente maschi e femmine; P=0,04). Il rs10741657 non è risultato in associazione con alcuna delle variabili cliniche o biochimiche prese in considerazione nei pazienti con SM (dati non mostrati).

Tabella 2
Caratteristiche degli SNPs analizzati del gene CYP2R1

Gene	Regione cromosomica	SNP	Allele ancestrale	Allele minore	Localizzazione SNP
CYP2R1	11p15.2	rs10741657 rs10766197	G G	A A	Promotore Promotore

SNP, single nucleotide polymorphism

Tabella 3
Analisi del rs10766197 del gene CYP2R1 in pazienti con Sclerosi Multipla e controlli

	Genotipo	Pazienti (n=105)	Controlli (n=160)	OR (95% IC)	P
CYP2R1 rs10766197	GG	16 (15%)	51 (32%)	Reference	
	GA	48 (46%)	66 (41%)	2,31 (1,18-4,54)	0,01
	AA	41 (39%)	43 (27%)	3,03 (1,5-6,15)	0,002
	G	80 (38%)	168 (53%)	Reference	
	A	130 (62%)	152 (47%)	1,79 (1,25-2,56)	0,001

IC, intervallo di confidenza 95%

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo selezionato e analizzato due SNPs nel gene che codifica per il *CYP2R1* scelti sulla base della letteratura, in cui è stata riportata l'associazione di entrambi gli SNPs con bassi livelli di 25-OH-D_3 in pazienti con asma e diabete; entrambe le condizioni cliniche e la SM condividono una patogenesi su base autoimmunitaria (15, 16). In particolare, sia lo SNP rs10741657 sia lo SNP rs10766197 si trovano nella regione del promotore del gene che codifica per il CYP2R1 e sono entrambi caratterizzati dalla sostituzione nucleotidica di una guanina con una adenina.

Nel nostro studio, esplorando l'associazione tra la 25-OH-D_3, le varianti del gene *CYP2R1* e la SM, abbiamo trovato livelli significativamente più bassi di 25-OH-D_3 nei pazienti rispetto ai controlli e un'associazione tra l'allele minore A del gene *CYP2R1* rs10766197 e il rischio di SM. L'analisi della distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche non ha rivelato nessuna differenza statisticamente significativa per rs10741657 del gene CYP2R1 tra pazienti e controlli.

Questo è il primo studio nel quale è stata identificata una potenziale influenza del rs10766197 del gene del CYP2R1 sul rischio di sviluppare SM. Recentemente, Laursen et al. hanno identificato una significativa associazione di un altro SNP del gene del CYP2R1 con il rischio aumentato di sviluppare SM (17) in uno studio trasversale sulla popolazione danese. Un dato estremamente interessante emerso dal nostro studio è l'associazione del rs10766197 con la progressione della malattia solamente nei pazienti di sesso maschile.

È ben documentato in letteratura che la SM, così come la maggior parte delle malattie autoimmunitarie, è caratterizzata da un dimorfismo sessuale che influenza sia l'incidenza che la severità della malattia. In generale, è stato riportato un più alto rischio di sviluppare la SM nelle donne, con un rapporto femmina: maschio di 2:1 – 3:1; di contro, i pazienti affetti da SM di sesso maschile presentano un'evoluzione della disabilità più rapida ed in generale un decorso peggiore della malattia (18-20).

Sono state avanzate diverse ipotesi per spiegare le differenze legate al sesso osservate nei pazienti con SM. Innanzitutto, è stato proposto un ruolo degli ormoni sessuali. Diverse evidenze hanno rivelato che gli estrogeni hanno un effetto sul sistema immunitario (21). Inoltre, una sinergia tra il 17-β-estradiolo (E2) e la vitamina D_3 è stata descritta in studi sperimentali su modelli murini di encefalomielite autoimmune (22). In particolare, la vitamina D_3 potrebbe stimolare la sintesi locale di E2 a livello cerebrale incrementando l'espressione del gene *CYP19A1*, che codifica per l'enzima che catalizza la conversione di androgeni in estrogeni nelle cellule gliali (23). E2, a sua volta, è un importante regolatore del metabolismo della vitamina D_3, potenziando i suoi effetti immunosoppressivi (24). Correale et al., analizzando la relazione tra la forma biologicamente attiva della vitamina D_3, ovvero la 1,25-OH_2-D_3, e gli ormoni sessuali femminili nei pazienti con SM, hanno trovato che la 1,25-OH_2-D_3 aveva un effetto immunomodulatore maggiore nelle donne rispetto agli

uomini (25). Studi su animali hanno rivelato che E2 potrebbe indurre l'accumulo di 1,25-OH_2-D_3 nelle femmine sia sopprimendo il trascritto del CYP24A1 (principale via di inattivazione della vitamina D), sia potenziando l'espressione del gene del VDR nel SNC (22). In aggiunta al loro ruolo sul sistema immunitario, sia gli estrogeni sia la 1,25-OH_2-D_3, svolgono un importante ruolo neuroprotettivo nel SNC. Gli estrogeni e la vitamina D_3 potrebbero, quindi, agire in sinergia per rallentare la progressione della malattia nelle donne. Pertanto, i soggetti di sesso maschile affetti da SM portatori delle varianti genetiche associate a ridotti livelli di vitamina D sono più suscettibili a una rapida progressione della malattia rispetto alle donne con SM portatrici della stessa variante grazie all'effetto protettivo esercitato dagli estrogeni. Nel nostro studio, abbiamo evidenziato che i soggetti con SM di sesso maschile portatori dell'allele minore A in omozigosi del rs10766197 del gene del CYP2R1 avevano un valore di EDSS e MSSS più alto e livelli sierici di 25-OH-D_3 più bassi rispetto alle donne con SM, portatrici dello stesso allele in omozigosi. Tuttavia, i livelli sierici di 25-OH-D_3 non erano significativamente differenti tra uomini e donne probabilmente a causa del numero relativamente piccolo di pazienti inclusi nello studio. Diversi Autori hanno mostrato che soggetti portatori del genotipo AA del rs10766197 del gene del CYP2R1 hanno livelli più bassi di 25-OH-D_3 rispetto ai soggetti portatori del genotipo GG, dopo aggiustamento per potenziali predittori, quali età, stagione e sesso (23, 24).

In conclusione, questo è il primo studio che ha identificato un ruolo del *CYP2R1* sia nel rischio di sviluppare SM che nella progressione della malattia nei soggetti di sesso maschile. Ulteriori studi sono necessari per meglio comprendere la complessa interazione tra fattori genetici, ambientali e ormonali nel differente sviluppo e progressione della SM nei maschi e nelle femmine.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Grant WB. Hypothesis - ultraviolet-B irradiance and vitamin D reduce the risk of viral infections and thus their sequelae, including autoimmune diseases and some cancers. Photochem Photobiol 2008;84:356-65.
2. Correale J, Ysrraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. Brain 2009;132:1146-60.
3. Smolders J, Thewissen M, Peelen E, et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. PLoS One 2009;4:e6635.
4. Nystad AE, Wergeland S, Aksnes L, et al. Effect of high-dose 1.25 dihydroxyvitamin D_3 on remyelination in the cuprizone model. APMIS 2014;122:1178-86.
5. Bivona G, Agnello L, Pivetti A, et al. Association between hypovitaminosis D and systemic sclerosis: True or fake? Clin Chim Acta 2016;458:115-9.
6. Snellman G, Melhus H, Gedeborg R, et al. Seasonal genetic influence on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a twin study. PLoS One 2009;4:e7747.
7. Engelman CD, Meyers KJ, Iyengar SK, et al. Vitamin D intake and season modify the effects of the GC and *CYP2R1* genes on 25-hydroxyvitamin D concentrations. J Nutr 2013;143:17-26.
8. Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. Neurol Sci 2016;37:261-7.
9. Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B, et al. VDBP, CYP27B1, and 25-Hydroxyvitamin D gene polymorphism analyses in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. Biochem Genet 2017;55:183-92.
10. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. Lancet 2010;376:180-8.
11. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, et al. Genome wide association study of circulating vitamin D levels. Hum Mol Genet 2010;19:2739-45.
12. Caruso A, Bellia C, Pivetti A, et al. Effects of EPHX1 and CYP3A4 polymorphisms on carbamazepine metabolism in epileptic patients. Pharmgenomics Pers Med 2014;7:117-20.
13. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 2011;69:292–302.
14. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. Neurology 2005;64:1144-51.
15. Ramos-Lopez E, Bruck T, Jansen P, et al. *CYP2R1* (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. Diabetes Metab Res Rev 2007;23:631–6.
16. Wjst M, Altmuller J, Faus-Kessler T et al. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signaling pathway. Respir Res 2006;7:60.
17. Laursen JH, Søndergaard HB, Albrechtsen A, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D levels in multiple sclerosis. Mult Scler 2015;21:1414-22.
18. Bove R, Chitnis T. Sexual-disparities in the incidence and course of MS. Clin Immunol 2012;149:201-10.
19. Golden LC, Voskuhl R. The importance of studying sex differences in disease: the example of multiple sclerosis. J Neurosci Res 2017;95:633-43.
20. Sadovnick AD. Differential effects of genetic susceptibility factors in males and females with multiple sclerosis. Clin Immunol 2013;149:170-5.
21. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. Ann Ist Super Sanita 2016;52:205-12.
22. Nashold FE, Spach KM, Spanier JA, et al. Estrogen controls vitamin D_3-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D_3 metabolism and receptor expression. J Immunol 2009;183:3672-81.
23. Krishnan AV, Swami S, Peng L, et al. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. Endocrinology 2010;15:32-42.
24. Correale J, Balbuena Aguirre ME, Farez MF. Sex-specific environmental influences affecting MS development. Clin Immunol 2013;149:176-81.

25. Correale J, Ysrraelit MC, Gaitan M. Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D_3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects. J Immunol 2010;185:4948-58.
26. Arabi A, Khoueiry-Zgheib N, Awada Z, et al. *CYP2R1* polymorphisms are important modulators of circulating 25-hydroxyvitamin D levels in elderly females with vitamin insufficiency, but not of the response to vitamin D supplementation. Osteoporos Int 2017;28:279-90.
27. Barry EL, Rees JR, Peacock JL, et al. Genetic variants in CYP2R1, CYP24A1, and VDR modify the efficacy of vitamin D_3 supplementation for increasing serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 2014;99:E2133-7.

Sicurezza del paziente e rischio clinico nel processo ematologico di laboratorio

Ada Aita[1], Francesca Tosato[2], Fiamma Balboni[3], Alessandra Fanelli[4], Giorgio Da Rin[5], Maria Gioia[6], Sara Francione[7], Maria Laura Ciardelli[8], Carlo Scapellato[9], Roberto Guerranti[10], Massimo Quercioli[11], Paola Pezzati[11], Alessia Tomei[12], Antonella Bassi[13], Sabrina Buoro[14] a nome dei Gruppi di Studio SIBioC: Rischio Clinico e Sicurezza del Paziente e Diagnostica Ematologica Integrata

[1]Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera- Università degli Studi di Padova, Padova
[2]Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera- Università degli Studi di Padova, Padova
[3]Medicina di Laboratorio, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA), Firenze
[4]Laboratorio Generale Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze
[5]Medicina di Laboratorio, Ospedale di Bassano del Grappa, ASL 7 Pedemontana
[6]Laboratorio di Chimica Clinica, Ospedale Abele Ajello, Mazara del Vallo
[7]Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Azienda Sanitaria Locale, Borgomanero (Novara)
[8]Analisi Chimico Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia
[9]Dipartimento di Emergenza Urgenza e Servizi Diagnostici, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena
[10]Unità Operativa Complessa Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena
[11]Sicurezza e Qualità in Laboratorio, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze
[12]Direzione Sanitaria, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza (IFCA), Firenze
[13]Servizio di Medicina di Laboratorio, ASST C. Poma, Mantova
[14]Unità Operativa Complessa Analisi Chimico Cliniche, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

ABSTRACT

Patient safety and clinical risk in the clinical laboratory haematological process. Patient safety, defined as the prevention of harm to patients, is the ultimate goal for medical laboratories. Risk management principles should therefore be considered an integral part of laboratory processes, especially of those activities directly impacting on patient care. This work aims to identify the most critical phases of haematological process and the risk reduction actions that improve patient safety. Risk analysis of the laboratory haematological process was carried out through Failure Mode, Effects and Analysis Criticality methodology. A form including the phases of the process, error modes and their possible effects, errors occurrence, detectability and severity scores and risk index (RI), has been prepared and sent to eight Italian laboratories. A multidisciplinary team performed the analysis in each laboratory, then two team leaders of the project comprehensively analysed the collected data. The process was divided in 8 phases (medical prescription, request acceptance, sample collection, transportation, reception and processing, results reporting and validation), 25 activities (17 pre-analytical, 4 intra-analytical, 4 post-analytical) and 43 failure modes. RI, calculated for each activity, ranged from 11 to 33. The most critical topics (RI >25) were: patient identification, peripheral blood smear review, interpretative comments and report validation. Staff training plays a central role in the entire laboratory haematological process and in the phases identified as critical. An effective management related to the attainment and maintenance of skills represents the best action in order to reduce risks of adverse events for patients. The promotion of procedures aimed to harmonize the interpretative comments and peripheral blood smear review is also pivotal.

INTRODUZIONE

Nel 1999, l'Institute of Medicine (IOM) ha riportato dati allarmanti sulle cause e l'impatto degli errori medici negli Stati Uniti (1), evidenziando la necessità di intraprendere misure urgenti a livello nazionale per affrontare il problema. Da allora, nonostante le iniziative volte a migliorare la sicurezza del paziente all'interno dei percorsi assistenziali siano aumentate esponenzialmente, i risultati concreti che grazie ad esse

Corrispondenza a: Ada Aita, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera- Università degli Studi di Padova, via Giustiniani 2, 35128, Padova. Tel.0498211753, Fax0498211981, E-mail ada.aita@aopd.veneto.it

Ricevuto: 15.01.2018 Revisionato: 21.05.2018 Accettato: 15.06.2018

Pubblicato on-line: 11.10.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.061

sono stati raggiunti si sono dimostrati di fatto meno rilevanti di quanto atteso (2). Nel tempo, la crescita della consapevolezza a livello mondiale dell'importanza della sicurezza del paziente, supportata dalle istituzioni di governo, dai sistemi sanitari nazionali e dalle associazioni dei consumatori, ha portato a profondi cambiamenti nella sanità così come nella medicina di laboratorio. Alcuni di questi cambiamenti hanno introdotto importanti innovazioni nella pratica clinica e di laboratorio, verso l'instaurarsi di una cultura diffusa di qualità e sicurezza (3,4). Uno degli obiettivi principali della medicina di laboratorio oggi è quello di garantire la sicurezza del paziente anche attraverso la gestione del rischio clinico. La gestione del rischio, inteso quale processo sistematico di identificazione e trattamento dei rischi attuali e potenziali del processo di cura (5), diventa requisito da soddisfare nelle recenti revisioni degli standard internazionali di certificazione (ISO 9001:2015) (6) e di accreditamento dei laboratori clinici (ISO 15189: 2013) (7), e gioca un ruolo determinante nell'erogazione di servizi di qualità. Il rischio clinico, definito come la probabilità che un paziente sia vittima di un evento avverso, che subisca cioè un qualsiasi danno o disagio imputabile, anche se in modo involontario, alle indagini, al trattamento ed alle cure mediche prestate durante il processo di cura, causando un prolungamento del periodo di degenza, un peggioramento delle condizioni di salute o la morte, può essere gestito attraverso iniziative messe in atto a diversi livelli (struttura sanitaria aziendale, regionale, nazionale), da gruppi conseguentemente multidisciplinari (8). Un'attività di gestione del rischio efficace si sviluppa in più fasi: segnalazione ed analisi dell'errore, individuazione e correzione delle cause di errore, monitoraggio delle misure messe in atto per la prevenzione dell'errore, implementazione e sostegno attivo delle soluzioni proposte (9). Il processo di gestione del rischio deve essere applicato a tutte le aree in cui l'errore può manifestarsi, dunque all'intero percorso assistenziale del paziente (8).

Gli esami di laboratorio rivestono un ruolo cruciale nell'intero processo di cura del paziente. Dati di letteratura riportano, infatti, che il 60-70% delle decisioni cliniche (ricoveri, dimissioni, terapie) è influenzato dai risultati delle indagini di laboratorio e che errori nel processo di laboratorio possono determinare gravi conseguenze sulla qualità delle strategie di trattamento e cura del paziente (10). Nell'intero processo della medicina di laboratorio, una delle discipline rilevanti, i cui risultati sono talora fondamentali per la qualità della gestione del paziente, è quella ematologica. L'esame emocromocitometrico, oltre ad essere una delle indagini maggiormente richieste nella pratica clinica, ed uno tra gli esami di laboratorio maggiormente informativi, può avere ricadute dirette, immediate o a lungo termine, sul paziente (11). La gestione dell'esame ematologico si presenta complessa in quanto caratterizzata da diversi sotto-processi (definizione di specifiche pre-analitiche, organizzazione del processo analitico, definizione e applicazione delle regole di validazione, gestione della revisione microscopica, gestione dei valori critici, modelli e modalità di refertazione) talvolta scarsamente armonizzati, e da una importante (talvolta fondamentale) componente umana caratterizzata da un diverso grado di specializzazione dei professionisti. A testimonianza di questa complessità nell'ambito del processo ematologico di laboratorio è stata pubblicata nel 2015 un'indagine comparativa tra diversi laboratori del territorio italiano (12).

Garantire la qualità del processo ematologico e sviluppare strategie di gestione per il miglioramento diventa dunque una priorità ai fini della sicurezza del paziente.

Alla luce di queste considerazioni, i due gruppi di studio SIBioC Diagnostica Ematologica Integrata e Rischio Clinico e Sicurezza del Paziente hanno avviato una collaborazione volta a promuovere un'analisi del rischio applicata al processo ematologico di laboratorio nella realtà Italiana. Questo lavoro ha lo scopo di individuare, per mezzo di un'analisi del rischio, le fasi maggiormente critiche del processo ematologico, e gli elementi del sistema sui quali intervenire per il contenimento del rischio ed il miglioramento della sicurezza del paziente.

MATERIALI E METODI

L'analisi del rischio, applicata all'intero processo ematologico di laboratorio, è stata condotta presso otto laboratori del territorio italiano selezionati su base volontaria e differenti per volumi di lavoro, organizzazione e provenienza geografica (Tabella 1).

Tra le innumerevoli tecniche di analisi del rischio (13), è stata scelta la metodologia denominata "Failure Mode, Effects and Criticality Analysis" (FMECA). Questa tecnica consente di identificare le potenziali modalità d'errore del processo, mettendo in evidenza le fasi maggiormente critiche, ovvero quelle in cui le modalità d'errore identificate mostrano allo stesso tempo un'elevata probabilità di accadere ed un'elevata gravità delle conseguenze. Più in dettaglio, FMECA prevede due tipi di analisi: la "Failure Mode and Effects Analysis" (FMEA) che permette di identificare le modalità d'errore che influiscono sul funzionamento di un sistema/processo, e la "Criticality Analysis" (CA) ovvero l'analisi quantitativa di ciascuna modalità d'errore, attraverso il prodotto di tre indici numerici che valutano rispettivamente: la probabilità che si verifichi un errore (VP); la gravità delle conseguenze derivanti dall'errore (G) e la probabilità che l'errore venga rilevato prima che si verifichi (R). A ciascun parametro è attribuito un punteggio su una scala numerica. Il prodotto dei tre indici (VP x G x R) consente di ottenere, per ciascuna modalità d'errore, un indice di rischio (IR) (14) che rappresenta una stima del rischio associato a ciascun errore.

Al fine di garantire la comparabilità dei risultati, è stata predisposta e condivisa una scheda per guidare ciascun laboratorio nella conduzione dell'analisi FMECA. La scheda è corredata di istruzioni per la compilazione e scale numeriche per la valutazione degli indici VP, G e R (Tabella 2).

Tabella 1
Caratteristiche dei laboratori italiani, sede dell'analisi del rischio applicata al processo ematologico

Provenienza geografica	Organizzazione					Volume di lavoro	
	Tipologia	Percorsi di assicurazione della qualità	Unità di personale impiegato nelle 24 ore espresso in "full time equivalent" (FTE)	Specialista di medicina di laboratorio (SpML) presente in laboratorio in turno di guardia attiva	Processo analitico	Tests /anno	Emocromi /giorno
Nord	Pubblico	Accreditamento istituzionale; Certificazione ISO 9001:2015	1,50 SpML e 2,0 TSLB	No	Catena di ematologia con strisciatore/ coloratore e sistema di microscopia digitalizzata integrati. Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di test riflessi e validazione in "middleware" dedicato.	4.500.000	1300
Nord	Pubblico	Accreditamento istituzionale; Accreditamento ISO 15189:2013; Certificazione ISO 9001:2015	2 SpML e 3 TSLB	No	Catena di ematologia con strisciatore coloratore integrato. Sistema di microscopia digitalizzata stand alone. Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di test riflessi e validazione in "middleware" dedicato.	8.700.000	1800
Nord	Pubblico	Accreditamento istituzionale; Certificazione ISO 9001:2015	1 SpML e 1 TSLB	No	Catena di ematologia con strisciatore coloratore integrato. Sistema di microscopia digitalizzata stand alone. Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di test riflessi e validazione in "middleware" dedicato.	2.900.000	730
Nord	Pubblico	Accreditamento istituzionale	1,5 SpML e 1,5 TSLB	No	4 analizzatori di cui 1 "stand alone" e 3 in catena; strisciatore/ coloratore in catena. Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di validazione in "middleware" dedicato.	3.200.000	750
Centro	Pubblico	Accreditamento istituzionale; Certificazione ISO 9001:2015	2 SpML e 2 TSLB	Si	Catena di ematologia con strisciatore coloratore integrato. Sistema di microscopia digitalizzata "stand alone". Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di test riflessi e validazione in "middleware" dedicato.	4.250.000	1100

Tabella 1
continua

Provenienza geografica	Organizzazione					Volume di lavoro	
	Tipologia	Percorsi di assicurazione della qualità	Unità di personale impiegato nelle 24 ore espresso in "full time equivalent" (FTE)	Specialista di medicina di laboratorio (SpML) presente in laboratorio in turno di guardia attiva	Processo analitico	Tests /anno	Emocromi /giorno
Centro	Pubblico	Accreditamento istituzionale; Certificazione ISO 9001:2015	1 SpML e 2 TSLB	Si	Catena di ematologia con strisciatore coloratore e sistema di microscopia digitalizzata integrati. Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di test riflessi e validazione in "middleware" dedicato.	3.000.000	600
Centro	Privato	Accreditamento istituzionale; Certificazione ISO 9001:2015	1,5 SpML e 0,5 TSLB	No	Catena di ematologia. No strisciatore coloratore automatico. Gestione dei risultati qualitativi e quantitativi con regole di validazione e test riflessi. No "middleware".	380.000	100
Sud	Pubblico	Accreditamento istituzionale	1,0 SpML e 1,25 TSLB	Si	Catena di ematologia con strisciatore/coloratore e sistema di microscopia digitalizzata integrati. Gestione risultati qualitativi e quantitativi con regole di test riflessi e validazione in "middleware" dedicato.	60.000	180

SpML, specialista in medicina di laboratorio; TSLB, tecnico sanitario di laboratorio medico.

La scheda riassume i punti chiave dell'analisi del rischio:
- definizione delle fasi e delle attività del processo;
- identificazione delle principali modalità d'errore e dei possibili effetti;
- identificazione dei fattori di contenimento presenti nell'organizzazione;
- attribuzione dei punteggi per ciascuno dei tre indici (VP, G e R);
- calcolo di IR.

La scheda d'analisi così formulata è stata inviata ai laboratori partecipanti (giugno 2016), i quali hanno provveduto all'analisi dei rischi del processo ematologico di laboratorio (luglio-dicembre 2016) ed alla compilazione della scheda.

Alla luce delle differenze in termini di modelli organizzativi, grado di automazione e completezza del referto riscontrate nei diversi laboratori italiani relativamente al processo ematologico di laboratorio (12), si è ritenuto opportuno definire chiaramente e collettivamente le fasi del processo prima di procedere all'identificazione dei possibili errori, delle conseguenze e dell'attribuzione degli IR.

La successiva analisi, in ciascun laboratorio arruolato per lo studio, è stata condotta da un gruppo multidisciplinare coordinato da un referente con precedente esperienza nella conduzione dell'analisi del rischio con la metodologia selezionata, costituito da specialisti di medicina di laboratorio (dirigente medico e/o biologo) e altri specialisti sanitari (tecnico di laboratorio, infermiere, personale amministrativo e ausiliario) con conoscenza dell'intero flusso del processo oggetto dello studio. A tutti i laboratori è stato chiesto di non costituire né gruppi troppo numerosi, al fine evitare lunghe discussioni sull'argomento, né poco numerosi, per garantire il punto di vista di tutto il personale quotidianamente coinvolto e la presenza di conoscenze e competenze sufficienti. Una volta compilate, le schede sono state inviate a due referenti, uno per ognuno dei due gruppi di studio SIBioC coinvolti, e da loro valutate nei diversi aspetti: nei contenuti descrittivi (definizione armonizzata delle fasi del processo ematologico di laboratorio, identificazione delle potenziali modalità d'errore e dei fattori di contenimento esistenti), nei dati numerici (analisi degli indici di rischio e identificazione delle fasi del processo caratterizzate

Tabella 2
Scale numeriche per l'attribuzione dei punteggi agli indici di valutazione della probabilità di accadimento, gravità e rilevabilità di ciascuna modalità d'errore

Punteggio	Descrizione	Note di valutazione
Indice di valutazione della probabilità di accadimento (VP)		
1	Remota	Si può verificare 1 caso su 10.000 (non esistono eventi noti)
2	Bassa	Si può verificare 1 caso su 5.000 (possibile ma non esistono dati noti)
3	Moderata	Si può verificare 1 caso su 2000 (documentata ma infrequente)
4	Alta	Si può verificare 1 caso su 100 (documentata e frequente)
5	Molta alta	Si può verificare 1 caso su 20 (documentata quasi certa)
Indice di gravità (G)		
1	Nessun danno	L'evento non ha comportato alcun danno oppure ha comportato soltanto un maggior monitoraggio del paziente
2	Danno lieve	L'evento ha causato un danno temporaneo al paziente e ha reso necessari interventi o trattamenti supplementari o un prolungamento della degenza al di sopra del valore medio del DRG specifico
3	Danno medio	L'evento ha causato un danno temporaneo al paziente (invalidità temporanea) e ha reso necessari un inizio o un prolungamento della degenza
4	Danno grave	L'evento ha causato un danno permanente al paziente (invalidità permanente) oppure ha generato un evento prossimo alla morte
5	Morte	Decesso del paziente
Indice di rilevabilità (R)		
5	Remota	L'evento viene rilevato 0 volte su 10 (rilevazione praticamente impossibile)
4	Bassa	L'evento viene rilevato 2 volte su 10 (probabilità bassa di rilevazione dell'errore)
3	Media	L'evento viene rilevato 5 volte su 10 (probabilità moderata di rilevazione dell'errore)
2	Alta	L'evento viene rilevato 7 volte su 10 (errore probabilmente rilevato)
1	Altissima	L'evento viene rilevato 9 volte su 10 (errore sempre rilevato)

DRG, raggruppamento omogeneo di diagnosi.

dal rischio maggiore), infine globalmente per l'identificazione dei fattori di contenimento.

Nella Figura 1, a titolo di esempio, si riporta una scheda compilata da uno dei laboratori aderenti al progetto relativamente alle fasi di refertazione e validazione del referto dell'esame emocromocitometrico.

RISULTATI

L'analisi delle schede ha permesso di definire le fasi del processo ematologico, di individuare gli errori principali e i possibili effetti da essi generati, e di definire le priorità d'intervento sulla base dell'IR calcolato tenendo conto dei fattori di contenimento già implementati nei diversi laboratori.

Definizione delle fasi e delle attività del processo ematologico di laboratorio

Il processo studiato è stato suddiviso nelle seguenti 8 fasi: prescrizione medica, accettazione della richiesta, prelievo di sangue, trasporto del campione, ricezione in laboratorio e processazione del campione, refertazione del risultato e validazione del referto. Ciascuna fase è stata ulteriormente suddivisa in attività. In totale sono state individuate 25 attività. La scomposizione del processo in fasi e attività è riportata nella Tabella 3.

Identificazione degli errori e dei possibili effetti generati dall'errore

Per ciascuna delle fasi e delle relative attività del processo, mostrate nella Tabella 3, sono stati individuati i principali errori (Tabella 4) rispetto alle procedure definite ed ai fattori di contenimento già presenti in ciascun laboratorio. In particolare, sono stati descritti i seguenti fattori di contenimento:

- l'utilizzo di documenti prescrittivi ed attivazione dei percorsi diagnostico-terapeutici ed assistenziali (PDTA) per favorire l'appropriatezza prescrittiva;
- l'adozione di istruzioni operative documentate e l'utilizzo di software dedicati per guidare il personale alla corretta accettazione della richiesta ed alla successiva stampa delle etichette per il prelievo;
- l'utilizzo del braccialetto identificativo e di strumenti informatizzati per l'etichettatura delle provette a partire dal foglio di accettazione del paziente a garanzia della corretta identificazione del paziente;
- l'utilizzo di sonde di rilevazione del tempo e della temperatura di trasporto per la verifica del mantenimento delle specifiche di trasporto definite;
- l'adozione di stazioni pre-analitiche per il corretto smistamento del campione una volta pervenuto in laboratorio;
- la gestione ed il monitoraggio attivo del CQI facilitati dalla disponibilità di adeguati software di supporto, la partecipazione a programmi di VEQ;
- l'adeguata formazione del personale nella fase di processazione del campione e produzione del risultato;
- l'implementazione di regole di validazione definite ed attuate tramite l'ausilio di "middleware" dedicati e dotati di sistemi di allarme e programmazione di test riflessi (striscio di sangue periferico e/o altri approfondimenti necessari);
- l'adeguata formazione del personale e la disponibilità di documenti ufficiali a garanzia della refertazione di risultati congrui con la situazione clinica del paziente;
- la disponibilità di adeguati supporti informatici a garanzia della tempestiva trasmissione dei risultati da parte del laboratorio e successiva visualizzazione da parte del clinico.

	FASE	ATTIVITÀ REPARTO	PRINCIPALI MODALITÀ DI ERRORE (Cosa può accadere?)	POSSIBILI EFFETTI (Cosa si può generare?)	FATTORI DI CONTENIMENTO (Con si può fare per evitare l'errore?)	G	VP	R	IR
7	REFERTAZIONE (Laboratorio)	7.1 VALIDAZIONE DEI RISULTATI STRUMENTALI	Generazione risultati errati o incompleti per regole di validazione non adeguate o non controllate o non rispettate	Mancata o ritardata esecuzione esame	Disponibilità di strumenti software e personale formato	3	2	2	6
				Risultato clinico non congruo	Criteri di validazione definiti, attuati tramite regole di validazione presenti in middleware dedicato dotato di sistema alert. Personale dedicato alla validazione clinica	4	2	2	6
		7.2 REVISIONE MORFOLOGICA DELLO STRISCIO PERIFERICO	Revisione morfologica mancata o errata o incompleta	Risultato clinico non congruo	Validazione effettuata con middleware dedicato, reflex tests in automatico. Personale formato e dedicato. Tracciabilità completa della revisione microscopica, barcode per il vetrino, prima lettura automatizzata	4	4	2	20
		7.3 INSERIMENTO DI COMMENTI INTERPRETATIVI	Inserimento mancato o errato o incompleto	Risultato clinico non congruo	Auspicabile la condivisione tra colleghi del laboratorio, con i medici dei reparti. Commenti codificati ed inseriti nei programmi gestionali. Utilizzo di documenti aggiornati da usare come guida	4	3	3	14
8	VALIDAZIONE DEL REFERTO	8.1 VALIDAZIONE DEL REFERTO	Mancata o errata validazione	Risultato clinico non congruo	Validazione effettuata con middleware dedicato, reflex tests in automatico. Personale formato e dedicato. Tracciabilità completa della revisione microscopica, barcode per il vetrino, prima lettura automatizzata	4	3	5	14
		7.4 PRODUZIONE DEL REFERTO FINALE	Produzione mancata o errata o incompleta	Risultato clinico non congruo	Disponibilità di programmi informatici	4	2	3	10
				Ritardata produzione risultato clinico		4	4	2	16
		8.2 COMUNICAZIONE DEI VALORI CRITICI	Mancata o ritardata comunicazione	Mancate o ritardate misure cliniche	Condivisione della gestione dei dati critici. Applicazione delle linee guida delle principali società scientifiche. La comunicazione deve essere annotata e specifica, indicando chi ha comunicato il dato critico, a chi, a che ora	5	2	4	12

Figura 1

Scheda dell'analisi di rischio condotta mediante metodologia "Failure Mode, Effects and Criticality Analysis" (FMECA). Esempio di analisi del rischio applicata alle fasi di refertazione dell'esame emocromocitometrico e validazione del referto in un laboratorio italiano. G: gravità delle conseguenze derivanti dall'errore; VP: probabilità che si verifichi un errore; R: probabilità che l'errore venga rilevato prima che si verifichi; IR: indice di rischio.

Tabella 3
Scomposizione del processo ematologico di laboratorio in fasi e attività

Fase del processo	Attività
1 Prescrizione medica (reparto o territorio)	1.1 compilazione della lista di esami
	1.2 verifica, controllo e trascrizione della lista
2 Accettazione (reparto o punto prelievi)	2.1 inserimento dati anagrafici
	2.2 inserimento codici analisi routine/urgenze/prioritari
	2.3 stampa etichette
	2.4 etichettatura delle provette
3 Prelievo (reparto o punto prelievi)	3.1 identificazione del paziente per la preparazione al prelievo
	3.2 preparazione del paziente
	3.3 identificazione del paziente al momento del prelievo
	3.4 prelievo di sangue
	3.5 registrazione del prelievo
	3.6 adozione delle modalità di conservazione del campione predefinite
	3.7 smistamento del campione
4 Trasporto (servizio trasporti)	4.1 raccolta campioni da trasportare
	4.2 mantenimento delle specifiche di trasporto (durata e temperatura predefiniti)
5 Ricevimento (laboratorio)	5.1 consegna dei campioni al servizio ricezione o alla postazione di pre-analitica del laboratorio
	5.2 consegna dei campioni presso l'area analitica dedicata
6 Processazione (laboratorio)	6.1 caricamento dei campioni su analizzatori ematologici
	6.2 produzione del risultato
7 Refertazione dell'esame (laboratorio)	7.1 validazione tecnica dei risultati
	7.2 revisione morfologica dello striscio periferico
	7.3 inserimento di commenti interpretativi e trasmissione del risultato
8 Validazione del referto (laboratorio)	8.1 validazione medica
	8.2 trasmissione informatica con produzione del referto
	8.3 comunicazione dei risultati critici

Nonostante i fattori di contenimento descritti facessero già parte delle organizzazioni dei laboratori partecipanti, sono stati individuati 43 possibili errori e per ciascuno sono stati riportati i possibili effetti conseguenti (Tabella 4). Generalmente un errore nel processo ematologico di laboratorio si riflette quasi sempre nella mancata e/o ritardata esecuzione dell'indagine richiesta, quindi nella mancata e/o ritardata produzione del risultato oppure nella produzione di un risultato clinico non congruo. Ciascuno di questi effetti immediati può generare un danno al paziente, poiché la diagnosi e/o il trattamento possono risultare ritardati o inappropriati.

A ciascuno degli errori è stato poi associato un indice di rischio ottenuto dalla moltiplicazione dei tre parametri VP, G e R, valutati sulla base delle scale numeriche fornite.

I dati riassuntivi condotti dall'analisi integrata delle 8 schede sono riportati nella Tabella 4. L'indice di rischio è stato riportato in termini di valore medio calcolato sul totale delle schede valutate.

Definizione delle priorità di intervento sulla base dell'indice di rischio calcolato

L'IR medio associato all'intero processo ematologico di laboratorio è risultato pari a 759,1. In particolare la fase pre-analitica, suddivisa in un numero maggiore di attività (n=17), ha registrato l'IR più elevato (509,3); al contrario la fase post-analitica (4 attività) ha riportato l'IR più basso (120,8) (Figura 2, pannello superiore). Le fasi di prelievo e validazione del referto sono risultate quelle a maggior IR (Figura 2, pannello inferiore). Gli IR medi,

Tabella 4
Scheda riassuntiva dell'analisi del rischio applicata al processo ematologico di laboratorio e condotta mediante metodologia "Failure Mode, Effects and Criticality Analysis" (FMECA) presso otto laboratori del territorio italiano. In grassetto gli IR >25

Fase del processo	Attività	Possibili effetti	IR
Prescrizione medica (reparto o territorio)	Compilazione incompleta o errata (medico di reparto: lista; medico di famiglia: ricetta)	Mancata esecuzione esame e/o esecuzione di esame non richiesto	21
	Mancato o errato controllo della trascrizione (infermiere professionale di reparto da lista/medico di famiglia da lettera dello specialista)	Mancata esecuzione esame e/o esecuzione di esame non richiesto	21
Accettazione (reparto o punto prelievi)	Errato inserimento dei dati anagrafici (ad esempio, codice fiscale, data di nascita)	Attribuzione dei risultati ad altro paziente Generazione di un campione non riconosciuto dal sistema (mancata o ritardata refertazione)	19 16,6
	Attribuzione o imputazione di codice analisi errato	Mancata esecuzione dell'esame e/o esecuzione di esami non necessari	14,6
	Stampa di etichette errate	Errata identificazione delle provette	12,4
	Errata etichettatura delle provette	Mancata o ritardata esecuzione dell'esame	12,4
	Mancata etichettatura delle provette	Mancata esecuzione dell'esame	13,8
Prelievo (reparto o punto prelievi)	Errata identificazione del paziente per la preparazione al prelievo	Preparazione di paziente errato	17,2
	Mancata o errata preparazione del paziente	Risultato clinico non congruo	14,6
	Errata identificazione del paziente al momento del prelievo	Attribuzione dei risultati ad altro paziente e mancata esecuzione esami al paziente	**26,8**
	Campione non idoneo (non sufficiente, coagulato, diluito per prelievo da via infusiva, provetta vuota, non raccolto)	Ripetizione del prelievo Risultato clinico non congruo	12,2 18,4
	Errata o mancata registrazione del prelievo	Ripetizione del prelievo	13,8
	Errata conservazione del prelievo prima dell'invio in laboratorio (ad esempio campione congelato)	Mancata o ritardata esecuzione esame	18
	Perdita dei campioni	Mancata o ritardata esecuzione esame Risultato clinico non congruo Ripetizione del prelievo	16,2 22,4 14
	Errato smistamento del campione in caso di provette provenienti da altri laboratori di destinazione	Mancata o ritardata esecuzione esame	14,25
	Errato smistamento del campione in caso di provette uguali ad altri laboratori di destinazione	Mancata o ritardata esecuzione esame	17
Trasporto (servizio trasporti)	Raccolta incompleta dei campioni depositati per l'invio in laboratorio	Mancata o ritardata esecuzione esame	16
	Campione trasportato a temperature inadeguate o per tempi lunghi (oltre 8 ore per richiesta di emocromo con formula leucocitaria)	Mancata o ritardata esecuzione esame Risultato clinico non congruo Ripetizione del prelievo	19,2 19,8 11,2

Tabella 4
continua

Fase del processo	Attività	Possibili effetti	IR
Ricevimento (laboratorio)	Consegna mancata o errata o incompleta	Mancata o ritardata esecuzione esame	21
	Consegna ritardata o in condizioni di temperatura inadeguate	Mancata o ritardata esecuzione esame	16,6
		Risultato clinico non congruo	20,4
		Ripetizione del prelievo	11,6
	Consegna mancata o errata o incompleta	Mancata o ritardata esecuzione esame	20,6
Processazione (laboratorio)	Mancato o non corretto caricamento dei campioni su analizzatori ematologici, (ad esempio, campione scorretto/insufficiente)	Mancata o ritardata esecuzione esame	13
		Risultato clinico non congruo	14,2
	Generazione risultati errati o incompleti per problemi tecnici strumentali	Mancata o ritardata esecuzione esame	14,8
		Risultato clinico non congruo	13,4
	Mancata generazione risultati per campione non riconosciuto dal sistema	Mancata o ritardata esecuzione esame	14,6
Refertazione dell'esame (laboratorio)	Generazione risultati errati o incompleti per regole di validazione non adeguate o non controllate o non rispettate	Mancata o ritardata esecuzione esame	13,2
		Risultato clinico non congruo	18,4
	Revisione morfologica mancata o errata o incompleta	Risultato clinico non congruo	**27,4**
	Mancato o errato o incompleto inserimento di commenti interpretativi	Risultato clinico non congruo	**27,2**
Validazione del referto (laboratorio)	Mancata o errata validazione	Risultato clinico non congruo	**33**
	Produzione mancata o errata o incompleta	Risultato clinico non congruo	22,6
		Ritardata produzione risultato clinico	18,6
	Mancata o ritardata comunicazione	Mancate o ritardate misure cliniche	19,4

IR, indice di rischio medio fra gli otto laboratori partecipanti.

che sulla base delle scale fornite potevano avere un valore compreso tra 1 e 125, hanno registrato valori compresi tra 11 e 33. In particolare, delle 25 attività individuate, 21 hanno registrato un IR <25 e 4 attività (3.3 identificazione del paziente al momento del prelievo, 7.2 revisione morfologica dello striscio periferico, 7.3 inserimento di commenti interpretativi, 8.1 validazione del referto) un IR >25. Queste ultime si sono dunque rivelate le fasi maggiormente critiche del processo ematologico di laboratorio, le quali necessitano di approfondita discussione per l'identificazione dei fattori di contenimento.

DISCUSSIONE

In un recente studio alcuni autori hanno applicato un'analisi del rischio utilizzando la metodologia FMECA ad uno specifico processo di laboratorio, la determinazione della resistenza alla proteina C attivata (APCr,) per ridurre la richiesta inappropriata della mutazione del fattore V di Leiden e ottimizzare le risorse, migliorando la qualità dell'intero processo. L'elevata variabilità presente in molte fasi del processo è responsabile di risultati scorretti, che conducono frequentemente a ripetizioni dell'esame, con conseguente aumento dei costi. I risultati dello studio confermano che la metodologia FMECA può essere un mezzo semplice, efficace ed utile per l'identificazione rapida delle criticità di un processo di laboratorio (17).

Nel nostro studio la stessa tipologia di analisi del rischio è stata applicata al processo ematologico all'interno del panorama nazionale attuale, coinvolgendo più centri nel tentativo di raggiungere una maggiore armonizzazione e comparabilità dei risultati ottenuti.

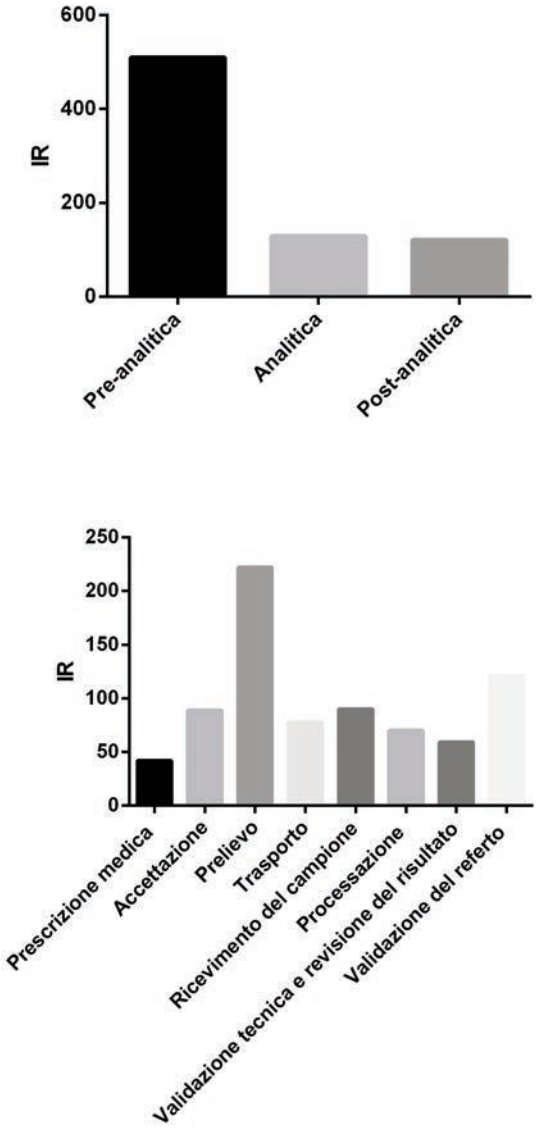


Figura 2
Indici di rischio medio (IR) del processo ematologico di laboratorio calcolati in 8 laboratori Italiani. Pannello superiore: IR associato alle fasi pre, intra e post-analitica. Pannello inferiore: IR associato a ciascuna delle 8 fasi principali del processo.

L'analisi ha permesso di definire le varie fasi del processo, i possibili errori e i relativi effetti, gli indici di rischio e conseguentemente, le priorità di intervento al fine di individuare e formalizzare le azioni di miglioramento preventive e correttive.

Sebbene gli otto laboratori partecipanti siano diversi per volume e tipologia di attività e quindi per livello di automazione, tutti hanno identificato in maniera univoca le fasi e le attività del processo ematologico di laboratorio. Le attività del processo sono risultate però più diffusamente automatizzate ed informatizzate nei laboratori con elevato carico di lavoro, risultando così più sicure per il paziente. È dimostrato, infatti, che l'implementazione di stazioni pre-analitiche automatizzate consente di prevenire errori possibili al momento della raccolta e gestione del campione (ad esempio errori di identificazione del paziente e del campione) (18), e che sistemi esperti per la validazione dei risultati strumentali siano meno soggetti all'errore rispetto a sistemi che prevedono la selezione manuale dei campioni (19, 20). In quest'ultimo caso, giocano un ruolo fondamentale i fattori umani (come ad esempio stress, distrazioni, scarsa osservanza delle procedure in essere, formazione inadeguata) ed i grandi volumi di lavoro. Tuttavia, è chiaramente riportato che, laddove le attività sono prevalentemente manuali, il tasso di errore, potenzialmente maggiore, è efficacemente controbilanciato da un minor carico di lavoro (9). I fattori umani comunque, possono avere un ruolo determinante nell'aumentare il rischio di errore anche all'interno dei sistemi esperti di validazione dei risultati. Gli allarmi informatici pre-impostati, infatti, devono essere osservati, valutati e gestiti da personale competente. Non vi è dubbio che, in ogni tipologia di laboratorio di ematologia, indipendentemente dalle dimensioni e dai volumi di lavoro, le competenze del personale assumano un ruolo centrale nel processo e debbano pertanto essere ampie e continuamente aggiornate (21).

Data la presenza estremamente variegata sul territorio nazionale, di soluzioni tecnologiche ed informatiche adottate dai diversi laboratori per la gestione del processo ematologico, è difficile e poco affidabile un'analisi e una discussione dell'indice di rischio per gruppi di laboratori suddivisi per volume di attività e soluzioni organizzative. Tuttavia, sebbene una diversa gestione delle attività dia origine a rischi diversi, tutti i laboratori hanno rilevato quali maggiormente critiche le stesse attività del processo e precisamente l'identificazione del paziente nella fase pre-analitica, la revisione microscopica nella fase analitica e la strutturazione dei commenti qualitativi informativi per il clinico e la validazione clinica del referto nella fase post-analitica.

L'accurata identificazione del paziente è fondamentale per assicurare che risultati giusti pervengano al paziente giusto, prevenendo così gravi conseguenze (22). Nonostante tali premesse, le linee guida rilasciate (23) e le forti spinte all'utilizzo, presso i reparti ospedalieri, di braccialetti identificativi riportanti il codice a barre (24), e di stazioni pre-analitiche automatizzate utili a garantire l'etichettatura delle provette immediatamente prima del prelievo e non successivamente alla raccolta (25), la fase di identificazione del paziente resta molto critica e gli errori di identificazione sono ancora rilevati quotidianamente (26). L'utilizzo del braccialetto identificativo e di stazioni pre-analitiche automatizzate costituiscono sicuramente i fattori di contenimento d'elezione per l'abbattimento dell'errore di identificazione, ma ancor più importante è l'educazione del personale al rispetto di procedure standardizzate per l'identificazione del paziente e dei campioni. L'identificazione di canali adeguati ed efficaci per la diffusione e l'educazione all'applicazione di queste procedure (incontri con il personale per la illustrazione delle procedure, diffusione delle procedure mediante posta elettronica e pagine web dedicate,

implementazione di avvisi su schermo che richiamino all'adozione di procedure standardizzate in caso di incongruenze del sistema), costituisce un ulteriore fattore di contenimento. È, infine, fondamentale, educare il personale alla segnalazione dell'errore superando così la cultura diffusa volta alla ricerca del colpevole. Sebbene sia comunemente noto che la conoscenza dell'errore è l'elemento chiave per l'identificazione di errori successivi e l'introduzione di nuove misure di controllo (27), oggi non è ancora possibile ottenere una stima precisa dell'incidenza di una specifica tipologia d'errore, a causa delle difficoltà di rilevazione ma soprattutto della mancata segnalazione, specialmente nei casi in cui l'errore non arreca danno al paziente. L'educazione del personale alla compilazione delle schede di "incident reporting", come nel caso di errori di identificazione del paziente, anche qualora questi non arrechino danno, induce il personale a classificare l'evento (evento o quasi evento), ma soprattutto ad avere consapevolezza del grado di pericolo per il paziente (28).

L'indice di rischio associato alla fase intra-analitica è risultato molto basso, soprattutto se confrontato a quello calcolato per le altre fasi del processo, a dimostrazione del fatto che il progresso tecnologico nell'ambito della diagnostica ematologica di laboratorio ha permesso la messa a punto di emocitometri di terzo livello che garantiscono una maggiore accuratezza diagnostica grazie all'introduzione di nuovi principi fisici per l'analisi cellulare e la progressiva evoluzione del software (29). Tuttavia, in questa fase del processo, rimane cruciale e critica allo stesso tempo, la valutazione morfologica delle cellule del sangue periferico (21). Il diverso grado di abilità del personale nell'interpretazione morfologica e la diversa terminologia utilizzata da operatori diversi per la segnalazione di eventuali alterazioni in aggiunta alla bassa riproducibilità intra-operatore, contribuiscono alla scarsa armonizzazione di questo importante strumento diagnostico (30, 31). Le azioni per il contenimento del rischio derivante da una cattiva gestione di questa attività non possono non passare che attraverso una spinta culturale volta alla promozione di percorsi formativi adeguati e ad un efficace sistema di gestione di sviluppo e mantenimento delle competenze (32). Sebbene esistano documenti ufficiali che riportano le competenze minime che il professionista in ematologia dovrebbe possedere (33), questi non sempre sono conosciuti ed i percorsi formativi in essere spesso non ne tengono conto. Alla stessa stregua, la valutazione ed il mantenimento delle competenze secondo metodi riconosciuti (34) vengono percepiti come un'attività superflua.

Percorsi di standardizzazione ed armonizzazione, già intrapresi nell'ambito della formulazione dei commenti interpretativi e oggetto di intenso dibattito scientifico (35), sono auspicabili anche in attività caratterizzate da un'elevata soggettività come la revisione microscopica.

È importante sottolineare che l'esame emocromocitometrico, inclusa la valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico, ha un importante ruolo nell'indirizzare percorsi di diagnosi e cura appropriati. Perché ciò avvenga, è indispensabile una corretta comunicazione delle informazioni quantitative e qualitative clinicamente utili attraverso il referto (35-37). Nonostante lo sforzo dei professionisti di laboratorio nel proporre soluzioni volte all'armonizzazione di queste attività (38-44), la formulazione dei commenti interpretativi e la validazione del referto restano attività molto critiche e registrano un IR più elevato tra tutte le attività studiate. Oltre al lavoro continuo verso l'armonizzazione, un'adeguata e completa formazione del personale per garantire la produzione di commenti interpretativi corretti ed appropriati pare essere ancora una volta di fondamentale importanza, per la riduzione del rischio per il paziente di andare in contro a percorsi di cura inappropriati. La valutazione di commenti interpretativi e di validazione di referti attraverso la partecipazione a programmi di VEQ potrebbe garantire la verifica delle competenze del personale coinvolto. È inoltre opportuno sottolineare che il processo ematologico termina con l'interpretazione da parte del clinico e non con la validazione del referto (45). In questo contesto, una maggiore spinta alla collaborazione attiva con i clinici è necessaria affinché le informazioni riportate sul referto risultino chiare, complete e comprensibili.

In sintesi, la promozione della cultura degli operatori alla segnalazione dell'errore e all'osservanza delle procedure in essere, la diffusione e la pronta disponibilità di procedure standardizzate e armonizzate riguardo all'identificazione del paziente e dei campioni, del prelievo e della gestione delle fasi analitica e post-analitica, l'efficace gestione dello sviluppo e mantenimento delle competenze del personale, la promozione di percorsi di armonizzazione delle fasi a maggiore intervento umano, sono elementi fondamentali per il contenimento del rischio nel processo ematologico di laboratorio.

È, inoltre, necessario precisare che al fine di garantire la qualità delle cure e la sicurezza del paziente non si può prescindere dall'applicazione dei principi del sistema qualità a tutte le fasi del processo.

CONCLUSIONI

L'analisi del rischio, applicata all'intero processo ematologico e condotta presso otto laboratori del territorio italiano, ha consentito di individuare, indipendentemente dalle dimensioni, dai volumi di lavoro e dalle soluzioni organizzative adottate, le fasi maggiormente critiche del processo, ovvero l'identificazione del paziente e dei campioni, la revisione microscopica, la formulazione dei commenti interpretativi e la validazione del referto. Dallo studio emerge inoltre che la formazione del personale riveste un ruolo centrale nell'intero processo ematologico di laboratorio e nelle fasi identificate come critiche. Pertanto un'efficace gestione dello sviluppo e del mantenimento delle competenze costituisce il principale fattore di contenimento del rischio per il paziente di andare incontro a eventi avversi. È inoltre fondamentale,

sensibilizzare il personale coinvolto sull'importanza che il processo ematologico di laboratorio riveste nell'intero percorso di cura del paziente e che dunque qualsiasi errore, generato dalla distrazione, dall'inosservanza o dalla mancata conoscenza delle procedure documentate in essere, può riflettersi in un esito negativo, talvolta grave, per il paziente.

Alla luce dei risultati ottenuti da questo studio, SIBioC, attraverso il lavoro sinergico del gruppo di studio Diagnostica Ematologica Integrata e di altri gruppi di studio societari, si sta impegnando all'individuazione di efficaci fattori di contenimento del rischio, primo fra tutti la gestione della formazione del personale coinvolto nel processo ematologico di laboratorio.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Institute of Medicine (US) Committee on Quality of Health Care in America; Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS, eds. To Err is Human: Building a Safer Health System. Source Washington (DC): National Academies Press (US), 2000.
2. Leape LL, Berwick DM. Safe health care: are we up to it? BMJ 2000;320:725-6.
3. Lippi G, Plebani M, Simundic AM. Quality in laboratory diagnostics: from theory to practice. Biochem Med 2010;20:126-30.
4. Howanitz PJ. Errors in laboratory medicine: practical lessons to improve patient safety. Arch Pathol Lab Med 2005;129:1252-61.
5. International Organization for Standardization (ISO). ISO Guide 73:2010. Risk management-Vocabulary. Geneva, 2010.
6. International Organization for Standardization (ISO). ISO 9001:2015. Quality management systems – Requirements. Geneva, 2015.
7. International Organization for Standardization (ISO). ISO 15189:2013. Medical laboratories – Requirements for quality and competence. Geneva, 2013.
8. Ministero della Salute. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico (DM 5 marzo 2003). Risk Management in Sanità. Il problema degli errori. Roma, 2004. http://www.salute.gov.it/imgs/c_17_pubblicazioni_583_allegato.pdf (ultimo accesso: Maggio 2018)
9. Vincent C. Patient safety. Second edition. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2010.
10. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med 2006; 44:750-9.
11. Buttarello M, Plebani M. Automated Blood Cell Counts: State of the Art AmJ Clin Pathol 2008;130:104-16.
12. Buoro S, Apassiti Esposito S, et al. Stato dell'arte della diagnostica ematologica nei servizi di Medicina di Laboratorio in Italia. Biochim Clin 2015;39:35-50.
13. International Organization for Standardization (ISO) and International Electrotechnical Commission (IEC). ISO/IEC 31010:2009. Risk management—Risk assessment techniques. Geneva, 2009.
14. Lipol L, Haq J. Risk analysis method: FMEA/FMECA in the organizations. Int J of Basic & Appl Sci IJBAS-IJENS 2014;11:74-82.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Management of Critical- and Significant-Risk Results. Approved Guideline,1st ed. CLSI GP47. Wayne, PA, 2015.
16. Lippi G, Mattiuzzi C. Critical laboratory values communication: summary recommendations from available guidelines. Ann Transl Med 2016;4:400.
17. Serafini A, Troiano G, Franceschini E, et al. Use of a systematic risk analysis method (FMECA) to improve quality in a clinical laboratory procedure. Ann Ig 2016;28:288-95.
18. Da Rin G. Pre-analytical workstations: a tool for reducing laboratory errors. Clin Chim Acta 2009;404:68-74.
19. Pronovost PJ, Thompson DA, Holzmueller CG, et al. Toward learning from patient safety reporting systems. J Crit Care 2006;21:305-15.
20. Ortiz E, Meyer G, Burstin H. Clinical Informatics and Patient Safety at the Agency for Healthcare Research and Quality. JAMIA 2002;9:s2-s7.
21. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. N Engl J Med 2005;353:498-507.
22. Altman DE, Clancy C, Blendon RJ. Improving patient safety--five years after the IOM report. N Engl J Med 2004;351:2041-3.
23. World Health Organization, Joint Commission and Joint Commission International. Patient Identification. Patient Safety Solutions 2007; 1: Solution 2. WHO Press, World Health Organization, Geneva, 2007. http://www.who.int/patientsafety/solutions/patientsafety/PS-Solution2.pdf (ultimo accesso: Maggio 2018).
24. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, et al. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. Clin Chem Lab Med 2006;44:150-60.
25. Wallin O, Söderberg J, Van Guelpen B, et al. Patient-centred care--preanalytical factors demand attention: a questionnaire study of venous blood sampling and specimen handling. Scand J Clin Lab Invest 2007;67:836-47.
26. Lippi G, Chiozza L, Mattiuzzi C, et al. Patient and sample identification. Out of the Maze? J Med Biochem 2017;36:107-12.
27. Aita A, Sciacovelli L, Plebani M. Laboratory-related errors: you cannot manage what you don't measure. You manage what you know and measure. Diagnosis 2017;4:193–5.
28. Restelli V, Noble M.A. Medical laboratory associated errors: The 33 month experience of an on-line volunteer Canadian province wide error reporting system. Diagnosis 2017;4:79–86.
29. Lecompte TP, Bernimoulin MP. Novel parameters in blood cell counters. Clin Lab Med 2015;35:209-24.
30. Zini G, Bain B, Bettelheim P, et al. A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European LeukemiaNet network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. Br J Haematol 2010;151:359-64.
31. Palmer L, Briggs C, McFadden S, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. Int J Lab Hematol 2015;37:287-303.
32. Leach AP, Haun DE. Assessing competence in finding and reporting abnormal morphologic features while scanning peripheral blood smears. Clin Lab Sci 2000 Summer;13:160-5.
33. College of American Pathologists. Competency Model for Pathologists. CAP Learning. March 2016. http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/DctmContent/education/Competency_Model.pdf (ultimo accesso: Maggio 2018).
34. Clinical Laboratory Standards Institute. Training and Competence Assessment. 4th Edition. Approved

Guideline, CLSI guideline QMS03. Wayne, PA. 2016.
35. Vasikaran S, Sikaris K, Kilpatrick E, et al. IFCC WG Harmonization of quality assessment of interpretative comments. Assuring the quality of interpretative comments in clinical chemistry. Clin Chem Lab Med 2016;54:1901-11.
36. Barth JH. Clinical quality indicators in laboratory medicine. Ann Clin Biochem 2012;49:9-16.
37. Tate JR, Myers GL, eds. Harmonization of clinical laboratory test results. EJIFCC 2016;27:5-14.
38. Price CP. Evidence-Based Laboratory Medicine: Is it working in practice? Clin Biochem Rev 2012;33:13-9.
39. Horvath AR. From evidence to best practice in laboratory medicine. Clin Biochem Rev 2013;34:47-60.
40. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. Ann Clin Biochem 2010;47:101-10.
41. Plebani M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clin Chim Acta 2009;404:16-23.
42. Stroobants AK, Goldschmidt HM, Plebani M. Error budget calculations in laboratory medicine: linking the concepts of biological variation and allowable medical errors. Clin Chim Acta 2003;333:169-76.
43. Buoro S, Da Rin G, Fanelli A, et al. Harmonization of interpretative comments in laboratory hematology reporting: the recommendations of Working Group on Diagnostic Hematology of the Italian Society of Clinical Chemistry and Clinical Molecular Biology (WGDH-SIBioC). Clin Chem Lab Med 2018. Epub ahead of print DOI: 10.1515/CCLM-2017-0972.
44. La Gioia A, Balboni F, Buoro S, et al. I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio. Biochim Clin 2016;40:255-69.
45. Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to-brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. Am J Clin Pathol 2011;136:829-33.

Disposizioni normative in Italia per la gestione dei Point of Care Testing: un'indagine SIBioC nelle regioni italiane

Erica Rampoldi[1], **Giovanna Patrucco**[2]
[1]Laboratorio Analisi, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Ovest Milanese, Ospedale di Legnano
[2]Laboratorio Analisi. Azienda Sanitaria Locale Ospedale S. Andrea. Vercelli, per il Gruppo di Studio POCT di SIBioC

ABSTRACT

Regolatory rules for the Point of Care Testing in Italy: a survey of the Italian Society of Clinical Biochemistry. Point-of-care testing (POCT) is a form of laboratory testing aimed to perform the analysis where healthcare is provided, close to or near the site of the patient care. It is a very common mode of providing laboratory testing, but concerns over the quality and errors of POCT have emerged from various sources. Regulations in different Countries and POCT operational guidelines have been produced by many professional groups and stakeholders, with the scope of minimizing testing errors and to built an efficient process. Since a national regulatory rule is lacking in Italy, a survey on the available local regulations has been conducted by the study group on POCT of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology in all the Italian Regions; the results are reported in the present paper. Local regional rules are rather divergent: some of them contain only essential indications while others are too detailed and difficult to apply. The lack of harmonization and regulation among Italian regions makes necessary the issuing of a national rule aimed to minimize the problems associated with POCT management to deliver to patients the best outcome

INTRODUZIONE

Il profondo cambiamento nell'erogazione dell'assistenza sanitaria di questi anni, pone una maggiore enfasi alla cura centrata sul paziente, rapida, efficiente ed efficace. Questo approccio, che utilizza ogni tipo di tecnologia disponibile, vede nei dispositivi di Point of Care Testing (POCT) un mezzo per permettere ai clinici di porre una diagnosi immediata e/o prendere una tempestiva decisione terapeutica. 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*". L'analisi eseguita vicino o al punto di cura del paziente, la facilità d'uso, il risultato immediatamente disponibile, il minimo ingombro e la trasportabilità della strumentazione, hanno fatto crescere enormemente negli anni la diffusione di tali strumenti. Questa rapida e continua espansione ha indotto le industrie del diagnostico a investire nella ricerca e nella commercializzazione dei POCT. Significative comunicazioni di settore evidenziano l'entità della crescita. Nel documento "Point-Of-Care Diagnostic Market Worth" si prevede un incremento di 27,5 miliardi di dollari entro il 2018, mentre nel rapporto "Zion Market research", si attende un aumento di 40,5 miliardi di dollari per il 2022 con una crescita del 10% tra il 2017 e il 2022 (1,2). Si tratta, tuttavia, di strumenti diagnostici che possono essere tanto utili quanto associati a rischi rilevanti e il loro governo è necessario per evitare gravi conseguenze per la salute dei pazienti. Negli Stati Uniti tra il 1984 ed il 1992, errori dovuti all'uso dei glucometri hanno portato a 24 casi di morte e danni a 986 pazienti, secondo i dati forniti dalla Food and Drug Administration (3). Contestualmente, da parecchi anni, è divenuta ben chiara la possibilità di errore legata all'uso di questi dispositivi. Molti Autori hanno evidenziato il rischio e proposto soluzioni atte a ridurlo, quali appropriati programmi di controllo di qualità e di formazione di personale. La presenza sul mercato di strumenti tecnologicamente progrediti con controlli automatici e temporizzati, programmi di controllo remoto efficaci e tempestivi, riduce ulteriormente il rischio (4,5).

Nella realtà italiana la diffusione dei POCT è un fenomeno di cui risulta impossibile stabilire la dimensione, poiché mancano statistiche affidabili e una precisa mappatura dei dispositivi in uso nelle realtà ospedaliere e territoriali. Inoltre, è difficile reperire informazioni circa il numero di gare pubbliche effettuate per l'acquisizione di questa strumentazione.

Molti Paesi, consapevoli della necessità di una gestione organizzata e strutturale, hanno emanato

Corrispondenza a: Erica Rampoldi , Laboratorio Analisi, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Ovest Milanese, Ospedale di Legnano, Telefono: 0331-449316 - e-mail: erampoldi@gmail.com

Ricevuto: 20.03.2018 Revisionato: 23.05.2018 Accettato: 27.06.2018

Pubblicato on-line: 25.09.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.057

normative nazionali e/o hanno scelto l'applicazione di norme ISO che fungano da guida per l'implementazione e la sorveglianza dei POCT.

In Italia non esiste una normativa nazionale, mentre esistono poche disposizioni regionali. Nell'intento di esaminare sistematicamente il contesto, è stata svolta a cura del gruppo di studio POCT di SIBioC, una ricerca sulla situazione normativa riguardante la gestione dei POCT nelle regioni italiane. La scelta di iniziare dall'indagine sulla situazione normativa deriva dal bisogno di conoscere la reale situazione italiana, e costituisce il punto di partenza per successive elaborazioni e proposte. Questo lavoro si propone infatti di essere il primo passo di una serie di approfondimenti su questa tematica.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata svolta formulando via e-mail, ai delegati regionali SIBioC, la richiesta di informazioni sull'esistenza o meno, di determine, delibere, documenti legislativi, ovvero disposizioni varie sulla gestione dei POCT, emanati dalle rispettive giunte regionali. Lo studio è stato condotto nel corso del 2017 ed i primi mesi del 2018. Hanno risposto 19 regioni.

RISULTATI

Dalle informazioni raccolte è stato possibile identificare tre diversi scenari (Tabella 1):

Gruppo 1 (9 regioni): nessuna normativa specifica. Abruzzo, Basilicata, Calabria, Campania, Friuli Venezia Giulia, Liguria, Molise, Toscana e Sicilia dichiarano che non è disponibile nessun documento relativo ai POCT o che sono state recepite solamente le Linee Guida SibioC (6).

Gruppo 2 (4 regioni e 2 Province Autonome): situazione intermedia

- Emilia Romagna: le disposizioni regionali in materia di accreditamento valgono per la gestione dei POCT.
- Marche: esiste un documento dell'Azienda Sanitaria Unica Regionale sulla riorganizzazione dei laboratori in ottica di rete, con riferimento ai POCT, in via di deliberazione.
- Provincia autonoma di Bolzano: è presente una normativa di vicinanza che si rifà alle Richt Linie des Bundes Aertze Kammer (RiLiBAeK, Guidelines of German Federal Medical Council) (7).
- Provincia autonoma di Trento: è presente un'istruzione operativa (IO) per la gestione dei glucometri per le strutture ospedaliere e territoriali dell'azienda provinciale per i servizi sanitari e per le residenze sanitarie assistenziali.
- Umbria: esiste un Decreto Deliberativo di gestione del paziente in Terapia Anticoagulante Orale (TAO) mediante POCT, in uso nella rete territoriale comprendente Case della Salute, ambulatori ospedalieri, farmacie.
- Valle d'Aosta: ha recepito la normativa della regione Piemonte.

Gruppo 3 (5 regioni): presenza di normativa specifica. Lazio, Lombardia, Piemonte, Puglia, Sardegna hanno deliberato specificamente sui POCT; si tratta di testi ben definiti, in vigore da anni per Puglia e Piemonte, in tempi più recenti per le altre regioni.

I riferimenti legislativi sono elencati nella Tabella 2.

DISCUSSIONE

Dall'analisi delle risposte emerge un quadro estremamente variegato, con numerose regioni che non hanno deliberato, mentre altre si sono dotate di strumenti normativi a vario livello. Anche la terminologia delle disposizioni spazia da regione a regione tra delibere, decreti, determine, progetti, requisiti, norme di accreditamento. Alcuni testi sono piuttosto generici, brevissimi ed aspecifici, altri anche troppo dettagliati e di difficile applicazione. Nondimeno le Società Scientifiche SIBioC e Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) hanno pubblicato linee guida (6,8) che dovrebbero costituire indicazioni operative importanti per i laboratori, sia in assenza che in presenza di disposizioni locali. In alcune regioni sono effettivamente un modello di riferimento.

Vengono brevemente discusse di seguito alcune delle situazioni esaminate.

Gruppo 1

Tra le regioni che non hanno normato vale la pena di citare la Basilicata che, nonostante l'impegno da parte di alcuni Laboratoristi nel produrre e proporre delle linee guida utili in ambito locale, non ha dato nessuna risposta istituzionale in merito.

Gruppo 2

Nella provincia Autonoma di Trento, l'omogeneità delle gare provinciali rende possibile l'applicazione di un'unica IO, che consente la perfetta comparazione dei risultati, semplifica le operazioni gestionali e permette di standardizzare i comportamenti operativi. Inoltre, la stessa IO può servire da modello per altre istruzioni da applicare in altri ambiti di utilizzo dei POCT (al di là dei glucometri). L'Umbria ha maturato una notevole esperienza territoriale per la gestione dei POCT per TAO, liberando risorse dall'ospedale e favorendo i pazienti che si trovano in località disagiate.

Gruppo 3

Puglia e Piemonte hanno preso spunto dalle linee guida SIBioC per le rispettive norme.

Dalla lettura dei documenti regionali si notano forti disparità di contenuti e alcuni casi di completa discordanza. In particolare, i glucometri in Lombardia non rientrano nella normativa che regola l'utilizzo dei POCT. Nonostante ciò esistono lodevoli realtà lombarde in cui il monitoraggio dei glucometri è svolto in maniera ottimale. La normativa del Lazio propone l'uso dei POCT solo per casi eccezionali e motivati, che sarebbero limitati ai glucometri, all'emogasanalisi, alla

Tabella 1
Presenza di normativa per Point of Care Testing (POCT) sul territorio nazionale

Gruppo 1 *nessuna normativa*	*Gruppo 2* *situazione intermedia*	*Gruppo 3* *normativa presente*
Abruzzo	Emilia Romagna	Lazio
Basilicata	Marche	Lombardia
Calabria	Provincia autonoma di Bolzano	Piemonte
Campania	Provincia autonoma di Trento	Puglia
Friuli Venezia Giulia	Umbria	Sardegna
Liguria	Valle d'Aosta	
Molise		
Toscana		
Sicilia		

Tabella 2
Riferimenti legislativi regionali per Point of Care Testing (POCT

Emilia-Romagna	Decreto Giunta Regionale 327/2004. Requisiti specifici per l'accreditamento.
Lazio	Decreto del Commissario ad acta (delibera del Consiglio dei Ministri del 21 marzo 2013) N. U00219 del 02/07/2014 Proposta n. 7663 del 28/04/2014.
Lombardia	Decreto n.252 del 21/01/2013. Indicazioni in merito alle attività dei servizi di medicina di laboratorio riguardo le attività di point of care testing.
Piemonte	Determina Dirigenziale 199 del 29 marzo 2010. Approvazione modalità e criteri per le attività analitiche eseguite con tecnologia POCT in ambito ospedaliero.
Provincia autonoma di Trento	Procedura Aziendale 18 novembre 2014 per la determinazione del glucosio nel sangue intero con glucosimetri.
Puglia	Bollettino Ufficiale Anno XLIII Bari, 7 giugno 2012 n. 83.
Sardegna	Progetto per la riorganizzazione della rete delle strutture pubbliche e private di diagnostica di laboratorio (art 1, comma 796, lettera O, legge 296/2006) Allegato alla Deliberazione n. 48/21 del 29/11/2007.
Umbria	Determina Dirigenziale 1046 del 03/08/2017. Procedura gestione del paziente in trattamento anticoagulante orale (TAO) nei Centri della Salute, negli ambulatori ospedalieri e nelle farmacie convenzionate con l'Azienda USL Umbria 1.

determinazione della troponina in emergenza e dell'acido lattico (solamente in rianimazione pediatrica). La Deliberazione della Sardegna attribuisce al laboratorio la responsabilità dei POCT e comprende IO e procedure ben dettagliate e complete sulla gestione degli stessi; la determina sottolinea come il diretto controllo della direzione del laboratorio di riferimento comporti la responsabilità della formazione degli operatori, della scelta delle apparecchiature e dei reagenti, nonché della verifica della manutenzione e della gestione del controllo di qualità.

Le contraddizioni dei documenti sopracitati costituiscono un fattore sfavorevole ai fini di una possibile futura armonizzazione normativa nazionale e sono un elemento che testimonia lo scollegamento tra le diverse regioni in ambito sanitario. Ulteriore segnale di assenza di coordinamento è una certa ciclicità normativa delle regioni, con disposizioni recentissime e altre più datate.

Esperienze internazionali

La gestione dei POCT è stata affrontata in Europa e in molti altri Paesi. La Francia ha adottato come modello le norme ISO 22870:2016; la Svizzera ha un complesso di disposizioni, concrete e chiare, definite Sistema Qualab (9); la Germania e l'Austria applicano le RiLiBAeK (7). La Gran Bretagna non ha una normativa stringente, ma ha una rete di verifiche di qualità capillare, con 4630 adesioni nel 2017, costituita dal programma di VEQ denominato UK NEQAS. Dalla lettura dei resoconti si evince, ad esempio, che i POCT sono sotto controllo VEQ per la coagulazione; il resoconto del 2017 descrive come l'adesione ai programmi UK NEQAS per la valutazione dei risultati del tempo di protrombina ottenuti con POCT sia in continua crescita nonostante l'introduzione dei farmaci anticoagulanti orali diretti. Le realtà di questi Paesi sono differenti, poiché sono dotati di sistemi sanitari molto diversi, ma testimoniano lo sforzo di regolamentare un sistema diagnostico complesso quale è quello dei POCT.

Al di fuori dell'Europa, l'Emirato di Dubai nel 2016 (10), ha emanato linee guida che organizzano i contenuti in modo estremamente schematico e sintetico, rimandando al sito del governo per gli aggiornamenti ed i dettagli. Estremamente interessante, è la rassegna australiana del 2012, che riassume le normative di varie nazioni e le norme ISO internazionali sui POCT (11). Nel caso specifico dell'Australia, non esiste una norma nazionale, bensì una serie di raccomandazioni che definiscono gli obiettivi minimi di qualità e di appropriatezza all'uso.

La lettura dei documenti di questi Stati mostra chiaramente le differenze culturali, sociali e di organizzazione sanitaria tra i vari Paesi, derivanti da storia, tradizioni e condizioni economiche difformi. Le normative sono quindi difficilmente esportabili da un Paese ad un altro, benché la loro lettura possa essere ricca di spunti e contengano principi generali di grande valore.

CONCLUSIONI

Questa indagine evidenzia il ritardo in Italia per normare sull'intero territorio nazionale questi strumenti diagnostici, almeno nelle linee essenziali. I POCT possono essere uno strumento utile quanto rischioso, visto l'utilizzo frequente dei risultati in tempo reale e sovente in regime di emergenza clinica, ambito che non concede tempo ai ripensamenti. Un esempio di pericolosità nell'uso indiscriminato dei glucometri è

Tabella 3
Suggerimenti per eventuale disposizione legislativa nazionale per Point of Care testing (POCT)

1. I sistemi analitici POCT
1.1 Descrizione e mappatura del sistema POCT (sede esatta di ubicazione degli strumenti)
2. La formazione nella gestione del POCT
2.1 Le responsabilità (nomi dei referenti e recapiti telefonici, indirizzo di posta elettronica)
2.2 La formazione del personale
2.3 Gli obiettivi formativi
2.4 La metodologia didattica
3. Assicurazione di qualità
3.1 Il controllo di qualità
3.2 Il controllo di qualità interno (CQI)
3.3 La verifica esterna di qualità (VEQ)
3.4 Il percorso di allineamento strumentale
4. Connettività
5. Validazione e firma
6. Criteri di accreditamento
7. Riferimenti normativi e Linee guida

descritto in un lavoro che si riferisce a pazienti di area critica (12). La facilità d'uso e l'apparente sicurezza dello strumento generano spesso automatismi operativi, noncuranza e deriva di procedura nonché eccessiva fiducia sulla affidabilità dei risultati generati; solo il continuo aggiornamento e formazione del personale permettono di arginare questi fenomeni. La mancata direzione dei POCT da parte dei laboratori e la relativa mancata assunzione di responsabilità per la diagnostica decentrata rischiano di diventare un'importante occasione perduta. Anche attraverso la gestione dei POCT, il laboratorio clinico può incidere su temi, troppo spesso trascurati, quali il contatto con la clinica, la visibilità del laboratorio, l'appropriatezza prescrittiva. Questi strumenti diagnostici costituiscono un mondo sommerso a causa della loro diffusione incontrollata, delle difficoltà di verifiche operative, delle connettività a volte scadenti e/o incomplete che scoraggiano gli approcci di tipo organizzativo. Il percorso di costruzione di un sistema POCT controllato e affidabile è assai lungo, graduale, a volte faticoso e insoddisfacente. Queste esperienze fanno parte del bagaglio di chiunque si sia accinto a costruire un sistema di gestione dei POCT; tuttavia, con il lavoro di gruppo si riesce spesso ad ottenere una buona collaborazione e scambi positivi con il personale non di laboratorio utilizzatore dei POCT: l'obiettivo è costruire una rete di persone e di strumenti che si consolidi nel tempo.

Una norma nazionale dovrebbe contenere linee d'indirizzo generali, lasciando particolarità e dettagli negli allegati regionali, più semplici e veloci da aggiornare e modificare. Alcuni punti fermi di una norma dovrebbero essere quelli elencati nella Tabella 3

C'è veramente bisogno di una norma nazionale che sani molte contraddizioni come quelle già citate. Il ritardo normativo va corretto, per essere alla pari di altre nazioni che hanno già affrontato il complesso problema della gestione delle analisi decentrate e del loro controllo. Le competenze del laboratorio sarebbero valorizzate, a completamento delle indispensabili competenze dei clinici, utilizzatori finali di tale importante strumento diagnostico.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i Delegati Regionali, i Colleghi e le Colleghe che hanno fornito informazioni e suggerimenti per la stesura del presente articolo. In particolare si ringrazia per il contributo critico e costruttivo il Dr. Marco Casati, ASST Monza. Gratitudine è dovuta anche al Dr. Beppe Carugo che con la sua Accademia di Qualitologia ha coordinato un gruppo di professionisti nella stesura di un Position Paper sui POCT.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. PR Newswire. Point-Of-Care Diagnostic Market Worth $27.5 Billion by 2018. DALLAS,September 12,2014. https://www.prnewswire.com/news-releases/point-of-care-diagnostic-market-worth-275-billion-by-2018-274885521.html (Ultimo accesso:giugno 2018).
2. GLOBE Newswire. Zion Market Research."Point Of Care Diagnostics Market by Products, by Prescription Mode (Prescription-Based Testing Kits and Over-The-Counter Testing Kits) Market for Hospitals, Clinics and Ambulatory Care Settings: Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, and Forecast, 2016 - 2022". Sarasota, FL July 13, 2017. https://globenewswire.com/news-release/2017/07/13/1043967/0/en/At-10-00-CAGR-Global-Point-Of-Care-Diagnostics-Market-Will-Reach-40-50-Bn-by-2022.html (Ultimo accesso: giugno 2018).
3. Murphy MJ, Paterson JR. Point-of-care testing: no pain, no gain. QJM: Int J Med 2001;94:571-3. https://academic.oup.com/qjmed/article/94/11/571/1563330 (Ultimo accesso: giugno 2018).
4. Plebani M. Does POCT reduce the risk of error in laboratory testing? Clin Chim Acta 2009;404:59-64.
5. James HN . Risk management for point of care testing. J Int Fed Clin Chem Lab Med 2014; 25:154-61.
6. Di Serio F, Trenti T, Carraro P, per il Gruppo di Studio SIBioC "Point-of-care testing". Raccomandazioni per l'implementazione e la gestione del "point-of-care testing" (POCT). Biochim Clin 2011; 35:242-52.
7. Westgard QC. Rilibaek: quality goals the German way. http://www.westgard.com/rilibak-2.htm. (Ultimo accesso: giugno 2018).
8. Coppolecchia P, Drago C, Rossi L, et al. PoCT e diagnostica decentrata. UPDATE 2016. Posizione SIPMeL del GdS Point of Care Testing. Riv Ital Med Lab 2016;12:14-25.
9. Qualab.http://www.cscq.ch/SiteCSCQ/FichierPDF_IT/MH-Manuale.pdf.(Ultimo accesso: giugno 2018).
10. Point of Care Testing Guidelines Health Regulation Department Dubai Health Authority 1 April 2016. https://www.dha.gov.ae/Documents/Regulations/Home%20Health%20Care% 20Regulation.pdf. (Ultimo accesso: giugno 2018.)
11. Review Policies, Procedures and Guidelines for point-of-care testing. Prepared on behalf of the RCPA Quality Assurance Programs Pty Ltd by Ian Farrance BSc MCB FAACB FRCPath April 2012 https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwixlJeKttfbAhVIUbwKHbgZBggQFjABegQIARAy&url=http%3A%2F%2Fwww.health.gov.au%2Finternet%2Fmain%2Fpublishing.nsf%2FContent%2F6BACE3D9026F7262CA257EF30004DD9E%2F%24File%2FPoCT%2520Policies%2520and%2520Procedures.pdf&usg=AOvVaw2luyiNqPyX4MsJThcvk_6f (Ultimo accesso: giugno 2018).
12. Critchell CD, Savarese V, Callahan A, et al. Accuracy of bedside capillary blood glucose measurements in critically ill patients. Int Care Med 2007;33:2079-84.

Qualità delle raccomandazioni o raccomandazioni di qualità? Il caso dell'antigene prostatico specifico nello screening del carcinoma della prostata

Mario Plebani
Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Medicina-DIMED, Università di Padova, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale di Padova

ABSTRACT

Quality of recommendations or recommandations of quality? The case of PSA-based screening for prostate cancer. The l'US Preventive Services Task Force (USPSTF) has recently revisited the evidence on PSA-based screening for prostate cancer recognizing the consistent 25% to 30% relative reduction in deaths from prostate cancer observed in two clinical trials. The most recent Task Force recommendation statement, supported by the evidence report and systematic review, has rightly changed the recommendation for prostate cancer screening - from a grade of D to a grade of C - stating that men aged 55 to 69 years should make an informed decision whether to undergo screening. This change was based on a better understanding of the evidence supporting early detection and recognition that active surveillance, rather than treatment, of low-risk cancers was becoming much more common. The USPSTF has provided a timely and careful approach to reassessment of the benefits and harms of PSA-based screening for prostate cancer. Patients, together with their physicians, should decide whether prostate cancer screening is right for the individual patient.

Nel numero di JAMA ("Journal of the American Medical Association") dell'8 maggio di quest'anno (2018), l'United States Preventive Services Task Force (USPSTF) ha pubblicato una raccomandazione - supportata da prove e da una revisione sistematica - sul tema, molto dibattuto, dello screening del carcinoma della prostata (1). In sintesi, la nuova raccomandazione, che da grado D diviene di grado C, suggerisce che gli uomini di età compresa fra 55 e 65 anni dovrebbero poter stabilire, sulla base di una decisione informata, se sottoporsi al programma di screening con la determinazione dell'antigene prostatico specifico (PSA). La raccomandazione precedente, datata 2012 (2), si basava essenzialmente sui risultati di due trial, uno realizzato in Europa che dimostrava un beneficio nello screening (3), ed un secondo realizzato negli USA che invece negava ogni beneficio (4). La raccomandazione più recente riconosce i limiti della precedente dovuti essenzialmente al bias legato ad una sostanziale contaminazione dei dati del PSA nei pazienti del gruppo di controllo. Rianalizzando i risultati, è emerso che la conclusione di entrambi gli studi è il riconoscimento della capacità dello screening di ridurre nell'ordine del 25-32% la mortalità per cancro della prostata (1). La determinazione del PSA come test di screening è un problema controverso sin dalla sua introduzione generalizzata nella pratica clinica a fine anni '80, ed alla successiva approvazione del test da parte della "Food and Drug Administration" (FDA) nel 1995. Benchè l'introduzione di questo biomarcatore sia subito stata considerata un "disruptive event" (ossia un evento capace di modificare la pratica clinica), aumentando drammaticamente l'incidenza di diagnosi di tumori negli stadi iniziali e riducendo significativamente le diagnosi di tumori in fase terminale e metastatica (stadio IV/ D), altri dati hanno generato il dibattito che, ancor oggi, è di attualità. In effetti, è ben nota la scarsa specificità del PSA, antigene che è presente nella prostata sana ed aumenta in molte situazioni non cancerose. L'insufficiente specificità della determinazione del PSA totale è stata dimostrata in vari lavori ma in particolare in uno studio randomizzato su 162.388 pazienti sottoposti a screening nel quale il 20% era stato poi sottoposto a biopsia con un esito negativo in 3 su 4 biopsie. Inoltre il 70% dei carcinomi identificati erano successivamente risultati di basso grado (forme non aggressive/indolenti), senza caratteristiche di invasività e potenziale metastatico (5). È noto che la biopsia

Corrispondenza a: Mario Plebani, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova, E-mail: mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 14.05.2018 Revisionato: 15.05.2018 Accettato: 15.05.2018

Pubblicato on-line: 14.09.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.053

prostatica è una pratica invasiva correlata a rischio di sanguinamento ed infezione, complicanze che richiedono l'ospedalizzazione in una percentuale significativa di casi che varia fra lo 0,5 ed il 6,9%. Ma non è questa la principale controindicazione dei programmi di screening basati sulla determinazione del PSA. Il reale problema è il rischio di diagnosi eccessiva ("overdiagnosis"), ossia di identificare carcinomi che non sarebbero stati mai diagnosticati durante la vita del soggetto e, come noto da decenni, osservati unicamente al momento dell'autopsia di pazienti deceduti per cause diverse e non correlate al carcinoma della prostata. Nella popolazione americana, il rischio di diagnosi eccessiva è stimato variare fra il 23 ed il 42%, mentre nei negli studi clinici condotti in Europa è ancor maggiore (62%) (6), ed il trattamento aggressivo ("overtreatment") in questi pazienti (prostatectomia o radioterapia) può determinare una riduzione della qualità di vita per il rischio di incontinenza, impotenza e disturbi intestinali.

La nuova raccomandazione, però, permette di mettere a fuoco alcuni dati oggettivi e rivedere il punto di vista da un'angolatura più coerente e centrata sul paziente. I dati degli studi, in particolare l'"European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer" (ERSPC) dimostrano che la riduzione della mortalità è attribuibile alla diminuzione (30%) dei carcinomi metastatici e che la morbidità associata alla malattia metastatica era stata in precedenza sottovalutata. Una riduzione della mortalità per carcinoma variabile fra 25 e 32%, quindi, non può essere ignorata, anche perché si associa ad altre prove (3). In primis, vengono sempre più utilizzati - in aggiunta alla determinazione del PSA totale - test riflessi ed algoritmi basati sulla determinazione di forme biologiche del PSA che migliorano la specificità dell'esame, per non parlare dei test genetici per il rischio di carcinoma, sempre più promettenti. In secondo luogo, si è visto che è possibile raccomandare un controllo del PSA a 2-4 anni di distanza anziché utilizzare un programma basato su controlli annuali, senza compromettere i benefici dello screening. Ma il valore reale della nuova raccomandazione, che giustifica l'offerta della determinazione del PSA nei soggetti di età compresa fra 55 e 69 anni, è basato sull'assunto del giudizio del medico e dei valori del paziente, ribadendo l'importanza della "shared decision making", ossia della decisione condivisa fra medico e paziente.

Auspico che SIBioC si appresti a ridiscutere le raccomandazioni che appaiono nel documento curato da Gion M e collaboratori (7), ma soprattutto che sia rivista un'impostazione culturale che pare voler sottostimare il valore dell'informazione di laboratorio in aree significative come quella dei marcatori tumorali. Ma ancora più importanti sono le risposte alla domanda *"Cosa significa per il laboratorio clinico l'impostazione basata sul consenso informato del paziente nell'approccio allo screening del carcinoma della prostata?"*

Il PSA, come ogni esame di laboratorio di provato valore clinico, è importante per consentire diagnosi accurate e precoci, ma non è una diagnosi. Gli aumenti del PSA dovuti a situazioni fisiopatologiche e patologie benigne sono noti e vanno, quindi, comunicati al paziente prima dell'esame, così come vanno comunicati i dati sulla possibilità di falsi-negativi.

a) L'esame di laboratorio, in questo caso e nel caso di molti altri nuovi biomarcatori ed esami, è in grado di fornire informazioni prima ed in assenza di segni clinici. Quindi fornisce un segnale di allarme che va valutato, interpretato, ed integrato dal clinico. Non è certo causa di diagnosi e trattamenti eccessivi di per sé, ma solo nel caso non vi sia una sua corretta interpretazione ed utilizzazione. A sua volta, la storia del PSA nello screening del carcinoma della prostata, ancora una volta, sottolinea che la nascita e la conclusione del ciclo dell'esame di laboratorio devono avvenire nel contesto clinico e del rapporto fra medico e paziente, negando la possibilità che l'esame di laboratorio sia un bene autoprescrivibile ed interpretabile da chi non conosce i suoi limiti e l'esigenza di inquadrare il risultato nel contesto clinico e delle altre informazioni diagnostiche. Per fare un paragone, anche nel caso della determinazione delle troponina cardiache, specialmente con i metodi ad alta sensibilità si è gridato al pericolo della sindrome detta *troponinite*, dovuta ad aumenti del marcatore in assenza di ischemia ed ostruzione delle coronarie. La verità è che aumenti di troponina sono sempre e solo segni di danno, anche modesto, del miocardio ma non sono diagnosi di infarto o sindrome coronarica acuta. Ed anche in questo caso, l'esame non dovrebbe essere autoprescritto ed autointerpretato per non generare non solo danni psicologici ma anche sottovalutazione di situazioni quali miocarditi, danni dovuti a patologie cardiache croniche, e all'assunzione di farmaci cardiotossici (ad esempio nella chemioterapia). Analogamente, nel caso di marcatori genetici e molecolari, è ancor più dimostrato il pericolo, anche drammaticamente grave, della richiesta ed interpretazione *fai da sé* (8, 9).
b) Le raccomandazioni e le linee guida hanno sempre maggior peso nella medicina moderna, ma è bene ricordare, come nel caso dello screening del carcinoma della prostata, che le stesse possono variare nel tempo anche in base all'evoluzione delle conoscenze e delle metodologie (spesso di laboratorio). Piuttosto che privilegiare meta-analisi e revisioni sistematiche, bisogna incoraggiare studi primari e prospettici ben disegnati, eseguiti con rigore metodologico e che siano basati su esami di laboratorio condotti secondo lo stato dell'arte, in centri accademici e di eccellenza. Non è l'adesione alle linee-guida, ma la ricerca traslazionale e clinica il vero motore del mantenimento e miglioramento della qualità dell'assistenza.
c) Anche nello specifico della raccomandazione già citata, la limitazione basata sull'età anagrafica (55-69 anni) è discutibile e potrà essere rivista. L'aumento di anziani con età superiore ai 70 anni in ottime condizioni di salute e con prolungate prospettive di vita,

assieme alle prove di maggior aggressività dei carcinomi della prostata nell'anziano, può portare ad allargare la fascia di età nella quale lo screening può essere proposto. Simili considerazioni possono essere fatte sulla base dell'acquisizione di prove che nei soggetti di razza afro-americana e con storia famigliare di mortalità correlata ad adenocarcinomi (non solo della prostata), lo screening può portare benefici superiori a quelli di soggetti maschili con rischio nella media.

In conclusione, benchè il PSA sia un marcatore tumorale imperfetto, rappresenta tuttora l'approccio più utilizzato e valutato per lo screening del carcinoma della prostata. Il pericolo di eccessive diagnosi e trattamenti deve essere minimizzato attraverso la conoscenza dei suoi limiti e delle sue potenzialità, ma prima di gettare via *il bambino con l'acqua sporca*, è meglio studiare, adottare rigorosità metodologica e diagnostica, e condividere con il paziente la scelta se sottoporsi o meno allo screening.

In ogni caso, il messaggio più importante è che l'esame di laboratorio diviene diagnosi se richiesto in modo appropriato, con il consenso informato del paziente, ed interpretato correttamente nel contesto clinico. Il *fai da sé* in medicina di laboratorio non solo è costoso per il Sistema Sanitario, ma soprattutto compromette la sicurezza del paziente e la qualità delle cure.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. US Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. JAMA 2018. doi:10.1001/jama.2018.3710.
2. Moyer VA. US Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med 2012;157:120-34.
3. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. ERSPC Investigators. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. Lancet 2014;384:2027-35.
4. Pinsky PF, Prorok PC, Yu K, et al. Extended mortality results for prostate cancer screening in The PLCO trial with median follow-up of 15 years. Cancer 2017;123:592-9.
5. Bokhorst LP, Zhu X, Bul M, et al. Positive predictive value of prostate biopsy indicated by prostate-specific-antigenbased prostate cancer screening: trends over time in a European randomized trial. BJU Int 2012;110:1654-60.
6. Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. Eur Urol 2014;65:1046-55.
7. Gion M, Trevisiol C, Rutjes AW, et al. Circulating tumor markers: a guide to their appropriate clinical use. Comparative summary of recommendations from clinical practice guidelines (PART 1). Int J Biol Markers 2016;31:e332-67.
8. Rockwell KL. Direct-to-consumer medical testing in the era of value-based care. J Am Med Assoc 2017;317:2485-6.
9. Plebani M. Quality and future of clinical laboratories: the Vico's whole cyclical theory of the recurring cycles. Clin Chem Lab Med 2018;56:901-8.

Antigene prostatico specifico, screening del cancro della prostata, linee guida e il giudice saggio

Massimo Gion
Centro e Programma Regionale Biomarcatori, Azienda ULSS 3 Serenissima, Venezia

ABSTRACT

PSA, prostate cancer screening, clinical practice guidelines and the "wise judge". PSA appeared since its earliest clinical use to be a promising tool for the early detection of prostate cancer (PCa) and several studies investigated its effectiveness in the screening of asymptomatic men. Three large randomized controlled trials involving 654,293 men, performed over the last 25 years, have been completed and results are now available. Two trials showed that PSA screening lead to an estimate of approximately 1 prostate cancer death avoided every 1000 men screened. The third, more recent, trial did not show any significant effect on PCa mortality after a 10 year follow-up. PSA screening also led to a risk reduction of 3 metastatic cases per 1000 screened men, but these findings did not reflect in a reduction of PCa specific mortality. The three studies confirmed a very high rate (50%) of overdiagnosis of indolent cancers, that increased the frequency of biopsy related complications and side effects due to treatments (incontinence, impotence, bowel dysfunction). In summary, benefits of PSA based screening of PCa are still debated while harms are established. A systematic search for clinical practice guidelines (CPG) published over prior 5 years identified 12 pertinent documents. CPGs unanimously agreed in recommending against PSA-based mass screening for PCa as a public health policy. Conversely, positions of CPGs are mixed concerning PSA for opportunistic screening: some CPGs recommend against, others recommend that an individualized risk-adapted strategy for early detection should be offered to well informed men with good performance status and 10-15 years of life expectancy. The comparative synopsis of CPGs shows the variability of decision-making in relation to the clinical problem and/or the context and offers to the physician the opportunity to "wisely" discuss with the patients all the possible choices supported by evidence.

SCREENING ORGANIZZATO E SCREENING OPPORTUNISTICO

Quando si parla di screening in campo medico è per prima cosa necessario definire la terminologia che si va a utilizzare, distinguendo in modo chiaro fra screening organizzato e screening opportunistico o spontaneo (1). Gli screening organizzati sono interventi di sanità pubblica offerti a fasce di popolazione generale predefinite per età o sesso, per i quali vi sono evidenze certe che il programma di screening garantisca a chi vi aderisce benefici superiori agli eventuali effetti collaterali negativi. Sono quindi interventi di provata efficacia, caratterizzati da una modalità di gestione altamente strutturata e monitorati con rigorosi controlli di qualità. Gli obiettivi che si prefigge lo screening organizzato per una data neoplasia sono: ridurre la mortalità specifica, ridurre l'incidenza di casi diagnosticati in fase avanzata, migliorare la qualità della vita e infine garantire l'equità di accesso alle prestazioni. Nello screening organizzato il Servizio Sanitario assume la responsabilità di invitare la popolazione bersaglio cui offre gratuitamente il test e di garantire, quando necessario, un percorso standardizzato di approfondimento.

Lo screening opportunistico o spontaneo è invece un intervento cui una persona sana e senza sintomi decide di sottoporsi di propria volontà o su suggerimento di altri (un sanitario, conoscenti, informazioni dei media). L'obiettivo che la persona si pone eseguendo il test è identificare precocemente un eventuale tumore silente, con l'aspettativa che la diagnosi tempestiva riduca il rischio di morire di cancro o di sviluppare delle metastasi. Lo screening spontaneo non ha procedure codificate di approfondimento, non può avvalersi di controlli di qualità di processo perché il processo non è codificato, e non consente di valutare oggettivamente i risultati in termini di popolazione. Infatti, nel caso dello screening spontaneo non esiste una registrazione sistematica degli

Corrispondenza a: Massimo Gion. Centro Regionale Specializzato per i Biomarcatori Diagnostici Prognostici e Predittivi, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda ULSS 3 Serenissima – Ospedale SS. Giovanni e Paolo – 30122 Venezia. E-mail: massimo.gion@aulss3.veneto.it

Ricevuto: 14.05.2018 Revisionato: 15.05.2018 Accettato: 15.05.2018

Pubblicato on-line: 14.09.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.054

eventi che permetta analisi su gruppi consistenti di casi (1).

Nel caso del tumore della prostata, l'antigene prostatico specifico (PSA) è stato considerato un buon candidato per identificare uomini con una probabilità post-test più elevata di avere un carcinoma della prostata da indirizzare alla biopsia. Per verificarne il possibile impiego in programmi di screening del carcinoma della prostata sono stati condotti numerosi studi. Tre studi più recenti con disegno randomizzato e controllato, nei quali un braccio è stato sottoposto a screening e un secondo braccio è stato utilizzato come controllo, sono stati eseguiti su numeri veramente elevati di partecipanti usando i criteri dello screening organizzato. Il primo studio ("European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer" [ERSPC]) è stato condotto in Europa dal 1993 al 2003 e ha reclutato 162.243 uomini; il secondo ("Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening" [PLCO] trial), condotto negli Stati Uniti dal 1993 and 2001, ha reclutato 76.693 uomini; il terzo studio ("The Cluster Randomized Trial of PSA Testing for Prostate Cancer" [CAP]) condotto nel Regno Unito dal 2001 al 2009, ha reclutato 415.357 partecipanti.

I BENEFICI

Riduzione della mortalità specifica per carcinoma della prostata

Lo studio europeo (ERSPC) ha mostrato una riduzione della mortalità di circa il 27% dopo 13 anni di follow-up (2); tuttavia, la riduzione non si è verificata in tutti i paesi partecipanti; in particolare, è degno di nota il fatto che nel paese in cui l'adesione è stata più numerosa (la Finlandia, che ha incluso il 49,4% di tutti i partecipanti allo studio) non si è evidenziato alcun beneficio in termini di mortalità negli uomini sottoposti a screening (3). Lo studio americano (PLCO) non ha mostrato differenze di mortalità specifica tra soggetti sottoposti a screening e controlli (4). Questo studio può essere visto come un confronto fra screening organizzato e screening opportunistico, dato che il braccio di controllo è risultato fortemente contaminato dalla esecuzione spontanea di PSA precedente all'entrata nello studio in un'alta percentuale dei soggetti arruolati. Recentemente, i dati del PLCO sono stati riesaminarti disaccoppiando i soggetti reclutati dai rispettivi bracci di allocazione e valutando le differenze fra i soggetti sottoposti a screening (sia organizzato che opportunistico) e quelli che non hanno avuto la determinazione del PSA (5). La valutazione, condotta mediante l'analisi dell'anticipo diagnostico medio ("Mean Lead Time") ha portato a calcolare una riduzione di mortalità specifica del 25-32% per i soggetti sottoposti a determinazione del PSA, simile a quella mostrata dallo studio ERSPC (5). Tuttavia, è opportuno rimarcare che si tratta di una valutazione basata su un modello matematico, che mette sullo stesso piano un approccio di screening organizzato e uno di tipo opportunistico; per contro, un'analisi specifica condotta all'interno dello studio ERSPC mostra che lo screening opportunistico è meno efficace e comporta più sovradiagnosi ([1]) rispetto allo screening organizzato (6). In conclusione, la stima di 1 decesso per cancro della prostata evitato ogni 1000 uomini sottoposti a screening con determinazione del PSA ripetuta più volte nel tempo e monitorati per 10-15 anni sembra un ragionevole riassunto delle evidenze prodotte dai due studi europeo e americano (7).

Il terzo studio (CAP), eseguito nel Regno Unito, ha incluso un numero molto più elevato di soggetti (415.357, quasi il doppio della somma di tutti gli uomini reclutati dai due studi precedenti) con l'intento di aumentare la precisione nella stima dell'effetto dell'intervento (8). Inoltre, ha basato lo screening su una sola determinazione di PSA con l'obiettivo di ridurre il rischio di sovradiagnosi e gli alti tassi di falsi positivi evidenziati nello studio ERSPC in seguito alle determinazioni multiple di PSA. Infine, il CAP è stato condotto nel decennio successivo rispetto a ERSPC e PCLO, consentendo quindi una valutazione dell'efficacia dello screening in un contesto diagnostico-terapeutico contemporaneo (8). Dopo un periodo di follow-up mediano di 10 anni, nel braccio sottoposto a screening la percentuale di uomini cui è stato riscontrato un carcinoma della prostata è risultata più elevata (4,3%) rispetto ai controlli (3,6%); tuttavia non si è riscontrata una riduzione di mortalità nei soggetti sottoposti a screening (0,30/1000 per anno) rispetto ai controlli (0,31/1000 per anno). Lo studio CAP, eseguito in un contesto diagnostico terapeutico attuale su una casistica corrispondente alla somma di quelle valutate dai due studi precedenti (ERSPC e PLCO), non conferma quindi l'efficacia dello screening sulla riduzione della mortalità cancro specifica né della mortalità per tutte le cause (8).

I risultati di tre grandi studi controllati e randomizzati condotti in 10 paesi di due continenti, che hanno esaminato 654.293 uomini reclutati nel corso di 16 anni e seguiti per un periodo variabile fra 11 e 18 anni, non hanno chiarito se la diagnosi tempestiva del cancro iniziale della prostata mediante screening basato sul PSA abbia un impatto significativo sulla mortalità cancro-specifica o sulla mortalità generale. Data l'estensione degli studi e la qualità di almeno due di essi, non è verosimile immaginare che ulteriori studi sullo screening del cancro della prostata con il PSA, ancorché guidati da centri accademici di eccellenza, possano dirimere la questione.

Inoltre, recentemente sono stati pubblicati i risultati dello studio "Prostate Testing for Cancer and Treatment" (ProtecT) che ha confrontato i risultati di diversi approcci terapeutici in uomini con carcinoma della prostata

[1]Sovradiagnosi (overdiagnosis in lingua Inglese): diagnosi di una situazione patologica o di una anomala che NON è associata a un reale rischio per la salute. (NdA)

iniziale (9). Lo studio, condotto nel Regno Unito dal National Institute for Health Research, ha esaminato 82.429 uomini sottoposti a screening con PSA e ha randomizzato 1.643 pazienti con tumore della prostata iniziale in tre bracci di trattamento: prostatectomia radicale, radioterapia esterna e sorveglianza attiva. A 10 anni di follow-up la mortalità specifica per cancro della prostata è risultata intorno al 1% indipendentemente dal tipo di trattamento. Da notare che il 44% degli uomini nel braccio in sorveglianza attiva hanno raggiunto i 10 anni di follow-up senza necessità di alcun trattamento attivo (chirurgia, radioterapia o trattamento ormonale). Gli autori fanno rilevare che la mortalità cancro-specifica riscontrata è considerevolmente inferiore ai tassi attesi quando lo studio fu iniziato e attribuiscono questa variazione almeno in parte al progressivo miglioramento dei trattamenti medici disponibili (9).

Complessivamente, i risultati dei tre studi ERSPC, PCLO e CAP, esaminati alla luce dei risultati dello studio ProtecT suggeriscono che difficilmente uno screening organizzato del carcinoma della prostata basato sul PSA potrà avere un impatto clinicamente e socialmente significativo su una mortalità cancro-specifica che oggi si attesta intorno al 1% a 10 anni dalla diagnosi.

Riduzione dell'incidenza della malattia metastatica

Lo studio ERSPC ha mostrato una riduzione del 30% del rischio relativo di sviluppare la malattia metastatica nel braccio di screening rispetto ai controlli a 12 anni di follow-up. Questo corrisponde, in termini assoluti, alla riduzione di 3 casi con malattia metastatica ogni 1000 uomini sottoposti a screening (10). Va notato che non si tratta di riduzione di mortalità, ma di riduzione del rischio di progressione metastatica (10). Questo beneficio sarebbe dovuto al riconoscimento iniziale di casi con PSA elevato e malattia probabilmente già diffusa, anche se subclinica; infatti, nel corso del monitoraggio la comparsa di metastasi è confrontabile nel braccio di screening (135 casi) e in quello di controllo (130 casi) (10). I responsabili dello studio ERSPC commentano questo inatteso elevato tasso di progressione nel braccio di screening formulando l'ipotesi che numerosi soggetti sottoposti a screening potessero avere una malattia avanzata occulta già al momento dell'entrata nello studio; in questo caso l'anticipo diagnostico sarebbe in realtà dovuto al "lead-time" bias (10). Il lead-time è il tempo che intercorre fra il riconoscimento della malattia con la procedura di screening e la presentazione clinica o strumentale della stessa; se si misura il tempo di sopravvivenza, è evidente che risulterà più lungo dal momento dello screening che dal momento della diagnosi clinica. In questo caso l'uso dello screening introduce una distorsione (bias) in quanto l'aumento del tempo di sopravvivenza dal punto di osservazione non corrisponde a un reale effetto positivo sul decorso della malattia.

Rilevanti anche i risultati di uno studio collaterale dello studio ProtecT, che ha esaminato gli esiti clinici dopo un follow-up mediano di 7,4 anni in uomini asintomatici esclusi dal protocollo principale per un valore di PSA ≥ 20 ng/mL (492 casi); questi soggetti sono stati confrontati con una coorte di 401 uomini, simili per caratteristiche, provenienti dal UK Anglia Cancer Network (ACN) nei quali il tasso di screening opportunistico con PSA era basso (11). L'obiettivo dello studio era verificare se lo screening potesse offrire vantaggi di sopravvivenza agli uomini nei quali si rilevava al primo passaggio un PSA elevato (≥20 ng/mL). I risultati mostrano una riduzione della mortalità cancro-specifica nel gruppo ProtecT (37 decessi) rispetto al gruppo ACN (63 decessi). Gli autori ipotizzano che il riconoscimento precoce della ricaduta possa portare ad una ridotta mortalità, ma sottolineano che l'effetto può essere almeno in parte dovuto anche in questo caso al lead-time bias nella coorte ProtecT (11).

L'impatto dello screening sull'identificazione anticipata di casi con malattia metastatica è stato recentemente analizzato anche con un approccio epidemiologico, esaminando cioè le variazioni di incidenza e mortalità del cancro della prostata negli Stati Uniti in relazione alle variazioni di tendenza, indotte dalle linee guida, nell'utilizzo del PSA come screening opportunistico (12). Lo studio ha evidenziato una riduzione approssimativa di incidenza del 6,5% per anno a partire dal 2007, in concomitanza con la disseminazione delle linee guida del US Preventive Services Task Force (USPSTF) che raccomandavano contro lo screening con PSA (13). Secondo gli autori, la riduzione di incidenza potrebbe avere però altre concause, inclusa la riduzione progressiva del pool di tumori indolenti, secondaria all'uso indiscriminato del PSA nei decenni precedenti. Parallelamente alla riduzione globale di incidenza, lo studio rileva un incremento del 6,6% dei casi diagnosticati in fase avanzata dal 2010 al 2014. Lo stesso studio evidenzia però che non aumentano i casi diagnosticati con fattori di alto-rischio ("Gleason score" elevato, estensione extracapsulare, PSA elevato), suggerendo che gli stadi più avanzati riscontrati possano rappresentare tumori presenti da più tempo piuttosto che più aggressivi. Nello stesso intervallo temporale, la mortalità cancro specifica rimane infatti stabile, inficiando la semplicistica interpretazione che un aumento dei casi diagnosticati in fase avanzata si traduca in un incremento della mortalità.

In relazione al possibile beneficio di una riduzione dell'incidenza della malattia metastatica si possono quindi condividere le conclusioni del gruppo di coordinamento del ERSPC che, a proposito dei risultati sull'anticipo diagnostico dei casi avanzati identificati con lo screening, affermano *The findings are clinically relevant but do not change the main downsides of screening, specifically overdiagnosis, that so far have prevented the introduction of screening for prostate cancer in most countries* (10).

I DANNI

Ciò che distingue lo screening del cancro della prostata basato sul PSA da programmi di screening di altre neoplasie (mammella, colon-retto, cervice uterina) rispetto al problema dei danni, è l'estensione di sovradiagnosi di tumori indolenti non letali, stimata intorno al 50% (7,10) combinata con la frequenza e la severità degli effetti collaterali del successivo percorso diagnostico e terapeutico. Partendo dagli effetti dei trattamenti, si stima che la chirurgia radicale possa causare impotenza in percentuali variabili dal 30% al 85% (14) e incontinenza dal 20% al 49%, mentre la radioterapia causerebbe impotenza dal 26% al 68% dei casi trattati (14) e complicanze intestinali, che possono essere severe nel 3-6% (14). Un'altra caratteristica da considerare quando si valuta il rapporto fra benefici e danni è il fatto che molti dei danni sono precoci e si verificano molto prima degli eventuali benefici, che si potranno riscontrare dopo anni.

Si deve anche ricordare che, in aggiunta alla sovradiagnosi, lo studio ERSPC ha evidenziato l'incidenza di risultati falsi positivi nel 12-13% di tutti gli uomini sottoposti a screening, cioè di casi nei quali un valore positivo di PSA ha portato ad un riscontro bioptico negativo (14). La stessa procedura bioptica può portare a complicanze diverse, fra le quali quella settica può avere ricadute severe; complicanze infettive serie o ritenzione urinaria si sono infatti verificate nello 0,5% - 1,0% (1 caso ogni 200-100) delle biopsie eseguite, ovviamente anche nei casi falsi positivi (14). È stato anche rilevato che alla riduzione dell'uso del PSA a scopo di screening negli Stati Uniti, conseguente verosimilmente al cambio della posizione delle linee guida sull'uso del PSA, non si è associata una riduzione delle complicanze della biopsia, che, anzi, sono aumentate dal 14% al 18% dal 2005 al 2014 (15).

Lo scenario si mostra decisamente complesso e condizionato da numerose variabili, che tra l'altro si modificano nel corso del tempo. Le evidenze disponibili relative alla diagnosi precoce del cancro della prostata mediante screening con PSA sono incerte e contraddittorie per quanto riguarda i benefici, mentre sono evidenti e condivise sul fronte dei danni. Per tale ragione nessuna linea guida sostiene l'opportunità di condurre programmi di screening organizzato del cancro della prostata basati sul PSA, in quanto l'ente organizzatore non disporrebbe di evidenze adeguate a garantire a chi vi aderisse che i benefici siano superiori agli effetti collaterali negativi. Come orientare invece medici e pazienti all'uso individuale del PSA per un eventuale screening spontaneo?

VALIDITÀ CLINICA, UTILITÀ CLINICA E LETTERATURA SCIENTIFICA.

La valutazione di un biomarcatore comprende tre successive fasi di convalida (16): la validità analitica, la validità clinica e l'utilità clinica. La validità analitica si riferisce all'accuratezza con cui un analita viene identificato e misurato da un dato test di laboratorio e si basa su criteri ben definiti che esulano dal tema di questo articolo. La validità clinica esprime l'accuratezza con cui un test è associato a una particolare condizione clinica (specificità diagnostica, sensibilità diagnostica, valore predittivo positivo e negativo, rapporto di verosimiglianza) o predice un esito clinico (ad esempio prognosi, predizione della risposa a un farmaco). L'utilità clinica si basa invece sull'analisi dei rischi e dei benefici che derivano dall'uso del test. La valutazione della utilità clinica deve quindi prendere in considerazione gli esiti medici, sociali e organizzativi associati al test e agli interventi indotti dai risultati positivi e negativi del test stesso. Un test non può avere utilità clinica se non ha validità analitica e validità clinica, ma un test con adeguata validità analitica e validità clinica può non avere utilità clinica. L'uso indistinto dei concetti di validità clinica e utilità clinica come sinonimi confonde il percorso di trasferimento delle conoscenze dalla letteratura scientifica alla pratica clinica.

La letteratura scientifica, molto schematicamente, si può catalogare su tre livelli: studi primari, meta-analisi e revisioni sistematiche e linee guida. Gli studi primari e le meta-analisi esaminano principalmente la validità clinica di un test; ne valutano cioè le caratteristiche diagnostiche (sensibilità, specificità), prognostiche o predittive in relazione ad un criterio di riferimento (ad esempio il riscontro bioptico, l'esito clinico), oppure per confronto con altri marcatori già consolidati. Le linee guida di pratica clinica considerano invece l'utilità clinica di un test; sono infatti documenti che contengono raccomandazioni finalizzate a ottimizzare l'assistenza al paziente basate su una revisione sistematica delle evidenze e su una valutazione di benefici e danni in confronto con opzioni assistenziali alternative (17). Le linee guida bilanciano quindi l'efficacia del test con variabili di contesto.

Studi primari, meta-analisi e linee guida non sono opzioni alternative cui il medico può arbitrariamente riferirsi secondo le necessità contingenti, ma elementi concatenati di un percorso di traduzione della conoscenza in azioni, definito "knowledge translation" (18). Si tratta di un processo articolato, basato su un ciclo dinamico che va dalla creazione di nuova conoscenza alla applicazione della stessa. Ogni fase del ciclo può avere pesi diversi e diversa rilevanza in relazione al contesto (18). Confutare la qualità di una o più linee guida può essere giustificato in un percorso costruttivo di miglioramento continuo; mettere invece in discussione le linee guida *per sé* come strumento di trasferimento della conoscenza alla pratica clinica fa correre il rischio di favorire la soggettività e l'arbitrarietà nelle decisioni mediche.

I LIMITI DELLE LINEE GUIDA E IL GIUDICE SAGGIO

Come si è detto più sopra, le linee guida esaminano le migliori evidenze disponibili in relazione alle variabili del contesto di applicazione, che comprendono, ad esempio, le caratteristiche del sistema assistenziale e dei modelli organizzativi, il quadro normativo e/o assicurativo, le risorse disponibili, aspetti etnici o culturali della

popolazione di interesse, l'efficacia delle terapie disponibili, i benefici e i rischi di opzioni alternative all'intervento oggetto della linea guida, le preferenze e i valori del paziente. È evidente come queste variabili possano mutare nel tempo o in aree geografiche diverse anche all'interno di una stessa nazione. Accade così che linee guida diverse possano esprimere raccomandazioni diverse su uno stesso quesito clinico, rendendone problematica l'applicazione e contribuendo a dare la percezione che le linee guida siano rigide e poco affidabili. Per favorire l'adattabilità delle linee guida a specifici contesti sono state sviluppate più metodologie di integrazione e implementazione delle evidenze, fra le quali l'armonizzazione di linee guida diverse o la sinossi comparativa. L'armonizzazione va a produrre una nuova raccomandazione bilanciata fra le raccomandazioni di linee guida diverse e si presta a essere applicata nel caso di raccomandazioni basate su evidenze forti, per le quali la variabile critica è il contesto. La sinossi comparativa è un approccio innovativo che ha l'obiettivo di mostrare al medico tutte le raccomandazioni presenti nelle linee guida, in modo da consentirgli una scelta autonoma e consapevole all'interno della cornice di evidenze possibili; si presta a essere applicata nel caso di raccomandazioni basate su evidenze deboli o contraddittorie, come nel caso dei marcatori tumorali. Una sinossi comparativa delle raccomandazioni sui marcatori tumorali è stata condotta da un gruppo di 74 ricercatori afferenti a 8 società scientifiche e all'Istituto Oncologico Veneto IRCCS coordinati dal Centro Regionale Biomarcatori della Regione Veneto, ed è stata pubblicata come numero monografico de I Quaderni di Monitor dall'Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali (AGENAS) (19). Sono stati identificati oltre 8000 documenti, dei quali 238 relativi a 21 tipi di neoplasie sono stati selezionati come linee guida e valutati per qualità metodologica. Le raccomandazioni e altre informazioni integrative presenti in questi documenti sono state sintetizzate e presentate in tabelle sinottiche.

Per quanto riguarda lo specifico quesito dell'uso del PSA per lo screening del cancro della prostata, oggetto di questo contributo, le quattro linee guida che ne considerano il possibile impiego in programmi di screening organizzato esprimono concordemente una raccomandazione negativa. Più articolata è invece la posizione delle dodici linee guida che valutano l'uso del PSA per lo screening opportunistico in soggetti asintomatici; mentre alcune si esprimo contro, altre suggeriscono che una strategia per la diagnosi precoce individualizzata e basata sul rischio può essere offerta a uomini adeguatamente informati con un buon "performance status" e un'attesa di vita di almeno 10-15 anni. La sinossi delle diverse linee guida riporta anche raccomandazioni relativamente alla determinazione del PSA in diverse fasce di età o in uomini appartenenti a diverse classi di rischio. Tutte le linee guida sono infine concordi nel raccomandare di condividere la scelta con il paziente dopo averlo accuratamente informato su rischi e benefici connessi con l'esecuzione del PSA a scopo di screening (19,20). In sintesi, le raccomandazioni presenti nelle linee guida esaminate nel documento citato consentono di adottare per lo screening opportunistico una strategia personalizzata, che conduca a una decisione condivisa con un paziente ben informato dal medico. A simili conclusioni è giunto anche il gruppo che ha prodotto l'edizione 2018 delle linee guida della US Preventive Services Task Force (21), presentate e discusse da Mario Plebani in questo numero della rivista (22).

È opportuno sottolineate che il manuale "Marcatori Circolanti in Oncologia: Guida all'uso Clinico Appropriato" da noi preparato (19), pubblicato anche in lingua inglese (20), non vuole essere e non è un'altra linea guida, non fornisce cioè altre raccomandazioni o consigli, ma presenta in maniera sintetica le raccomandazioni delle diverse linee guida mettendole a confronto fra loro. L'elemento fortemente innovativo del nuovo modello è che esso offre al medico la possibilità di scegliere in modo autonomo e critico fra tutte le opzioni sostenute da evidenze, adattandosi alla possibile variabilità del processo decisionale in relazione al problema clinico e/o al contesto. Questo approccio è inteso a ridurre il rischio di utilizzo improprio di singole linee guida per sostenere o confutare in modo univoco una decisione medica. Ma è risultato anche efficace per esplorare criticamente tutte le linee guida, identificando bisogni diagnostico-terapeutici ancora senza risposta e contribuendo a stimolare una discussione costruttiva delle possibili criticità.

In riferimento a questa operazione di analisi e presentazione sinottica delle linee guida vale la pena di citare l'aneddoto del giudice saggio, utilizzato da Marinella Sclavi nel suo interessante libro "*Arte di ascoltare e mondi possibili*" per enfatizzare come in situazioni contraddittorie sia costruttivo assumere che tutte le posizioni possano avere componenti positive (23) ([2]). L'ottica del "giudice saggio" consente al medico di bilanciare i propri giudizi sulle evidenze in relazione alle cornici dei diversi contesti e aiutare così, in modo equilibrato, il paziente a scegliere in base ai suoi valori e alle sue preferenze, tenendo conto di evidenze spesso complesse e a volte non univoche.

[2]La citazione è tratta da Alessandro Manzoni, Scritti di teoria letteraria- Discorso sul romanzo storico, Rizzoli, Milano 1981.
Un mio amico, di cara e onorata memoria, raccontava una scena curiosa, alla quale era stato presente in casa di un giudice di pace in Milano, val a dire molt'anni fa. L'aveva trovato tra due litiganti, uno de' quali perorava caldamente la sua causa; e quando costui ebbe finito, il giudice gli disse: Avete ragione. Ma, signor giudice, disse subito l'altro, lei mi deve sentire anche me, prima di decidere. È troppo giusto, rispose il giudice, dite pure su, che v'ascolto attentamente. Allora quello si mise con tanto più impegno a far valere la sua causa; e ci riuscì così bene, che il giudice gli disse: Avete ragione anche voi. C'era lì accanto un suo bambino di sette od ott'anni, il quale, giocando pian piano con non so qual balocco, non aveva lasciato di stare anche attento al contraddittorio; e a quel punto alzando un visino stupefatto, non senza un certo che d'autorevole, esclamò: Ma babbo! non può essere che abbiano ragione tutt'e due! Hai ragione anche tu, gli disse il giudice. Come poi sia finita, o l'amico non lo raccontava, o m'è uscito di mente; ma è da credere che il giudice avrà conciliate tutte quelle sue risposte, facendo vedere tanto a Tizio, quanto a Sempronio, che se aveva ragione per una parte, aveva torto per un'altra.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Osservatorio Nazionale Screening. I programmi di screening in Italia. Centro nazionale per la prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM), Ministero della Salute, 2014.
2. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. ERSPC Investigators. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. Lancet 2014;384(9959):2027-35.
3. Kilpeläinen TP, Tammela TL, Malila N, et al. Prostate cancer mortality in the Finnish randomized screening trial. J Natl Cancer Inst. 2013;105:719-25.
4. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL III, et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. J Natl Cancer Inst 2012;104: 125-32.
5. Tsodikov A, Gulati R, Heijnsdijk EAM, et al. Reconciling the Effects of Screening on Prostate Cancer Mortality in the ERSPC and PLCO Trials. Ann Intern Med. 2017;167:449-55.
6. Arnsrud Godtman R, Holmberg E, Lilja H, et al. Opportunistic testing versus organized prostate-specific antigen screening: outcome after 18 years in the Göteborg randomized population-based prostate cancer screening trial. Eur Urol. 2015;68:354-60.
7. Pinsky PF, Prorok PC, Kramer BS. Prostate Cancer Screening - A Perspective on the Current State of the Evidence. N Engl J Med. 2017;376:1285-9.
8. Martin RM, Donovan JL, Turner EL, et al. CAP Trial Group. Effect of a Low-Intensity PSA-Based Screening Intervention on Prostate Cancer Mortality: The CAP Randomized Clinical Trial. JAMA. 2018;319:883-95.
9. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. N Engl J Med. 2016;375:1415-24.
10. Schröder FH, Hugosson J, Carlsson S, et al. Screening for prostate cancer decreases the risk of developing metastatic disease: findings from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). Eur Urol. 2012;62:745-52.
11. Johnston TJ, Shaw GL, Lamb AD, et al. Mortality among men with advanced prostate cancer excluded from the ProtecT Trial. Eur Urol. 2017;71:381-8.
12. Negoita S, Feuer EJ, Mariotto A, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part II: Recent changes in prostate cancer trends and disease characteristics. Cancer. 2018;124:2801-14.
13. US Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med. 2008;149:185-91.
14. Chou R, Croswell JM, Dana T, et al. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 201;155:762-71.
15. Gershman B, Van Houten HK, Herrin J, et al. Impact of Prostate-specific antigen (PSA) screening trials and revised psa screening guidelines on rates of prostate biopsy and post-biopsy complications. Eur Urol. 2017; 71:55-65.
16. Hayes DF. Biomarker validation and testing. Mol Oncol. 2015;9:960-6.
17. IOM (Institute of Medicine). Clinical Practice Guidelines We Can Trust. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
18. Straus SE, Tetroe JM, Graham ID. Knowledge translation is the use of knowledge in health care decision making. J Clin Epidemiol. 2011;64:6-10.
19. Gion M, Trevisiol C, Rainato G, et al. Marcatori Circolanti in Oncologia: Guida all'uso clinico appropriato. I Quaderni di Monitor, AGENAS, 2016.
20. Gion M, Trevisiol C, Rutjes AWS, et al. Circulating tumor markers: a guide to their appropriate clinical use. Comparative summary of recommendations from clinical practice guidelines (PART 2). Int J Biol Markers 2017; 32:e1-e52.
21. US Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. JAMA 2018; 319:1901-13.
22. Plebani M. Qualità delle raccomandazioni o raccomandazioni di qualità? Il caso del PSA nello screening del carcinoma della prostata. Biochim Clin 2018;42:326-8.
23. Sclavi M. Arte di ascoltare e mondi possibili. Come si esce dalle cornici di cui siamo parte. Milano: Bruno Mondadori, 2003.

Diagnostica di laboratorio del rischio nefrolitiasico

Giovanni Cangiano[1], Elvira Di Maina[1], Grazia Buccino[1], Annamaria Errico[1], Pia Improta[1], Annachiara Latte[2], Maria Capuano[3], Roberta Rossano[3], Andrea Apuzzo[3], Angela Lamanna[5], Cesare Polito[5], Francesca Nuzzi[4], Maurizio D'amora[6], Antonio Tufano[7], Antonio Sarappa[1]

[1]Laboratorio di Patologia Clinica Presidio Ospedaliero dei Pellegrini ASL Napoli 1 Centro
[2]Laboratorio di Farmacia Ospedale Santa Chiara di Trento
[3]Nefrologia e Dialisi Presidio Ospedaliero dei Pellegrini ASL Napoli 1 Centro
[4]Nefrologia Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale Pausillipon-Santobono, Napoli
[5]Dipartimento di Pediatria, Università Luigi Vanvitelli, Napoli
[6]Laboratorio di Patologia Clinica Presidio Ospedaliero S. Maria del Popolo degli Incurabili ASL Napoli 1 Centro
[7]Urologia Policlinico Umberto I, Roma

ABSTRACT

Laboratory diagnostics of the nephrolithasic risk. The urinary metabolic study is carried out for the evaluation of patients at the first episode of lithiasis but mainly for the monitoring of patients on therapy in order to prevent lithiasis recurrences. Following the indication of the general practitioner or of the nephrologist, our laboratory performs the analysis of both daily and first morning urine to extrapolate the tendency (relative supra-saturation) to form the most common urinary calculi (calcium oxalate, mono calcium phosphate acid, uric acid). In this paper we review the role of the different ions and urinary components in favoring or inhibiting stone formation. Then, we present the whole workflow for the characterization of the tendency of kidney stones formation, from the instructions to the patient for the collection of urines to the interpretative report. Regarding the analytical issues, we briefly present the methods, not commercially available, developed in our center that can be adapted to common biochemical analyzers allowing a complete characterization of the lithiasic tendency without the use of more specialized instrumentation.

INTRODUZIONE

Lo studio metabolico urinario effettuato su paziente affetto da calcolosi renale, è utile per classificare la malattia, per chiarire le sue cause e per valutare l'efficacia delle scelte terapeutiche (1). Sotto indicazione del medico di medicina generale o del nefrologo, il nostro laboratorio effettua la determinazione degli analiti nelle urine del mattino e delle 24 ore al fine di estrapolare la tendenza (supersaturazione relativa) nel formare i più frequenti calcoli urinari (calcio ossalato, calcio fosfato mono acido ed acido urico). In questa esposizione, basata sull'esperienza decennale del nostro centro, dopo una rassegna sui fattori favorenti e inibenti la formazione di calcoli, presentiamo indicazioni sulle modalità di raccolta urinaria, sull'uso di alcune metodiche non presenti in commercio, da noi proposte ed adattate su strumentazione biochimica ed infine sull'utilizzo di un programma dedicato per la gestione dei dati con refertazioni personalizzate.

GENERALITÀ E FORMAZIONE DEL CALCOLO

La nefrolitiasi è una condizione clinica che si manifesta in forma sintomatica con prevalenza del 10% negli uomini e del 5% delle donne (2): il 75% di queste persone subisce una ricaduta almeno un'altra volta nel resto della propria vita. I fattori di rischio litogeno sono dovuti principalmente a condizioni nutrizionali e metaboliche e la maggior parte dei calcoli contiene calcio, sotto forma di calcio ossalato e fosfato (70-80%); l'acido urico rende conto di circa il 15% dei calcoli; percentuali più basse (3% circa) hanno i calcoli da infezione (struvite, carbapatite ed urato di ammonio), e quelli di cistina (1-2%). Rare sono le forme ereditarie (xantina e 2,8-diidrossiadenina) (3).

La calcolosi renale mostra un'associazione epidemiologica con il sovrappeso, l'obesità, l'ipertensione arteriosa, il diabete e la sindrome metabolica, tutte condizioni che hanno uno stretto rapporto con l'alimentazione. Ecco quindi che la terapia

Corrispondenza a: Giovanni Cangiano, Laboratorio di Patologia Clinica Presidio Ospedaliero dei Pellegrini ASL Napoli 1 Centro, E-mail: gianni.cangiano@libero.it

Ricevuto: 08.04.2018 Revisionato: 13.04.2018 Accettato: 08.06.2018

Pubblicato on-line: 24.09.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.055

medica della calcolosi renale, e in particolare quella dietetica dovrà essere indirizzata alla correzione e prevenzione non solo dei fattori di rischio di recidive litiasiche ma anche ai fattori di rischio di danno renale e cardiovascolare (4-7).

La formazione di qualsiasi tipo di cristallo è possibile solamente in una soluzione supersatura che favorisce l'aggregazione di cristalli che, diventando sempre più grandi, danneggiano le cellule tubulari, rimanendovi adesi. Questo processo può indurre la progressiva formazione del calcolo che è favorita anche da una bassa concentrazione di inibitori della cristallizzazione. Pertanto, la nefrolitiasi dipende dalla rottura dell'equilibrio tra fattori che promuovono e che inibiscono l'aggregazione dei cristalli. I principali ioni che, cristallizzando, contribuiscono alla formazione dei calcoli sono: calcio, ossalato, urato e fosfato; gli inibitori della cristallizzazione includono invece magnesio, citrato, pirofosfato (8-9).

I PRINCIPALI PARAMETRI NUTRIZIONALI DELLO STUDIO METABOLICO

Volume urinario

La diluizione delle urine, abbassando la concentrazione urinaria dei sali litogeni, ha un ruolo fondamentale nel ridurre l'incidenza di episodi litiasici (10). Il volume di diuresi da ottenere nelle 24 ore dovrebbe essere di almeno 2 litri. Un'indicazione meno oggettiva che non obbliga a misurazioni volumetriche può essere quella di assicurare una urina chiara e non gialla. Tutte le acque sono consigliabili purché con basso contenuto di sodio. Sono sconsigliati invece il succo di pompelmo e di mela per l'alto contenuto di vitamina C precursore dell'ossalato. L'assunzione dovrebbe essere distribuita nel corso di tutta la giornata per assicurare un volume urinario costantemente elevato. Il consiglio è di introdurre 250-300 mL di liquidi ogni ora sia durante la giornata che, in caso di risveglio, nelle ore notturne; un maggiore apporto è indicato nei periodi estivi e in presenza di attività fisica. Almeno metà dei liquidi introdotti dovrebbero essere rappresentati dall'acqua per evitare la presenza di sostanze controindicate (11).

Calcio

L'escrezione urinaria rende normalmente conto del bilancio tra quota di calcio assorbita a livello intestinale e quota di calcio depositata o rilasciata dal rimaneggiamento continuo del tessuto osseo. L'ipercalciuria è sostenuta da eccessivo assorbimento intestinale, da eccessivo riassorbimento osseo, o da diminuzione del riassorbimento tubulare renale. Una volta escreto nelle urine, il calcio non è molto solubile come sale sia di ossalato che di fosfato e, quindi se in eccesso, precipita e determina la formazione di calcoli. La dieta ipocalcica indiscriminata aumenta il numero delle recidive, se confrontata ad una dieta normocalcica (12). L'indicazione più corretta da dare ai pazienti, soprattutto in assenza di screening metabolico, è di seguire una dieta normocalcica. Tranne che per i rari casi di ipocitraturia (11-13), il calcio normalmente si lega al citrato che ne impedisce quindi la precipitazione nelle urine; inoltre una sua carenza a lungo andare crea un bilancio negativo che nelle donne può favorire l'osteoporosi.

Citrato

È presente in frutta e verdura. È un prodotto intermedio del metabolismo ossidativo, liberamente filtrato dal glomerulo, riassorbito in misura variabile nel tubulo prossimale, e non secreto a livello tubulare. L'acidosi aumenta il consumo mitocondriale di citrati e, in conseguenza di ciò, ne riduce la concentrazione citoplasmatica. Il citrato è un anione presente nelle urine ed è particolarmente importante nel ridurre la soprasaturazione dei sali litogeni, attraverso tre azioni: chelante nei confronti del calcio a livello urinario; di anti-aggregazione sui cristalli; di alcalinizzazione urinaria. Ne deriva che la riduzione della citraturia è tra le principali cause della litogenicità (14).

Sodio

La presenza di sodio nella dieta incrementa l'escrezione tubulare del calcio (in particolare negli ipercalciurici), aumentando di fatto il rischio litogeno. Per ridurre l'escrezione urinaria di calcio è utile ridurre l'apporto alimentare di sodio (10). Si consiglia perciò di non superare i 3,5 g/die di cloruro di sodio. (15).

Solfati

Le proteine introdotte con alimenti animali hanno un effetto pro-litogeno, in quanto sono acidificanti e quindi aumentano l'escrezione renale di calcio e riducono quella di citrato. La presenza di solfati, quale indice indiretto di apporto di proteine animali, si correla con la diminuzione proporzionale del pH, fattore che incrementa la possibilità di precipitazione litiasica. L'apporto proteico non dovrebbe superare la quantità di 0,8 g per kg di peso corporeo, in massima parte da fonti di origine vegetale (10, 16, 17).

Alimentazione vegetariana

Una alimentazione principalmente vegetariana può essere utile in quanto presenta un elevato contenuto di acqua, fibre, potassio, magnesio, carbonato e citrato, un limitato contenuto di proteine e sodio, ed un ridotto contenuto di acidi grassi saturi e colesterolo. Ne deriva una riduzione della calciuria e aumento del citrato e pH. L'utilizzo di proteine vegetali è da preferire per la calcolosi ossalo-calcica e in particolare per quella di acido urico (16).

Ossalato

L'ossalato urinario di origine alimentare rappresenta solo il 10-20% dell'ossalato escreto, essendo la restante

parte di origine endogena (metabolismo dell'acido ascorbico e di alcuni aminoacidi) (18). Infatti fino a 70-100 mg/die di ossalato vengono metabolizzati e degradati da batteri normalmente presenti nel lume intestinale, come l'*Oxalobacter formigens* (19). L'unica modalità di eliminazione è rappresentata dal rene, che utilizza un meccanismo di secrezione tubulare presente nel tubulo contorto prossimale. Le indicazioni dietetiche prevedono quindi una riduzione moderata dell'assunzione di ossalato, escludendo soltanto gli alimenti che ne sono molto ricchi (frutta secca, spinaci, cioccolato) mentre la sua restrizione deve essere più attenta in caso di dieta ipocalcica o di patologie infiammatorie intestinali, o in presenza di steatorrea, perché in questi casi si verifica un aumento dell'assorbimento intestinale di ossalato. La vitamina C è un noto precursore dell'acido ossalico, e ne è quindi sconsigliata l'assunzione a dosaggi elevati (20). È preferibile limitare o escludere dalla dieta i seguenti alimenti ricchi in ossalato: spinaci, rabarbaro, prezzemolo, erba cipollina, bietola, barbabietola rossa, verza, pomodori verdi, the verde, cacao in polvere, cioccolato. Si consiglia di lessare le verdure in abbondante acqua acidulata per favorire la fuoriuscita degli ossalati (21).

Acido urico

L'iperuricuria è importante nella calcolosi da acido urico, molecola che deriva dal metabolismo delle purine e poco solubile a pH acido. Alimenti da limitare o evitare nella dieta abituale sono rappresentati da: frutti di mare, acciughe, sardine sott'olio, aringa, caviale, frattaglie, estratti di carne, brodo di carne, cacciagione, intingoli, carni e pesci grassi (22).

Carboidrati

Un carico di glucosio induce un aumento della calciuria: la riduzione dell'apporto di zuccheri semplici (e di calorie nel suo complesso) è quindi un provvedimento sicuramente utile. È opportuno moderare il consumo di fruttosio che, avendo un effetto acidificante, può portare alla cristallizzazione dell'acido urico. Una certa attenzione deve essere posta a non eccedere con la frutta, per l'elevato apporto di zuccheri semplici che ne deriverebbe, le bevande alcoliche, i dolci ed i dolcificanti (23, 24).

FASE PRE-ANALITICA. MODALITÀ DI RACCOLTA DEI CAMPIONI URINARI

Le indagini metaboliche non dovrebbero essere eseguite in corso o a breve distanza di tempo da un episodio di calcolosi. Infatti è essenziale che il paziente venga studiato in condizioni basali, dopo aver ripreso le normali consuetudini di dieta e di stili di vita (8).

La raccolta delle urine delle 24 ore può essere facilmente effettuata in ambito domiciliare. Il laboratorio rilascia agli interessati un apposito kit contenente un foglio di istruzioni, etichette adesive per i contenitori, modulistica per eventuali richieste a carico del Servizio Sanitario Nazionale, due provette contenenti i conservanti pericolosi (una con 5 mL di acido cloridrico concentrato e l'altra con 2 mL di clorexidina digluconato 20%) ed infine il relativo modulo di assunzione di responsabilità da firmare.

Il paziente effettua la raccolta scartando l'urina al risveglio e raccogliendo tutte le minzioni fino alla prima urina del mattino seguente. L'urina di ogni minzione si divide in due aliquote che vengono riposte in due differenti recipienti da 2,5 litri. Il primo contiene 5 mL di acido cloridrico concentrato, necessario ad evitare la formazione dei precipitati di calcio (25). Nel secondo contenitore sono invece presenti 2 mL di clorexidina, necessaria alla determinazione di alcuni analiti urinari ma principalmente alla determinazione del pH. La clorexidina infatti è un potente battericida che impedisce la degradazione dell'urea e quindi l'alcalinizzazione delle urine. Ad ogni minzione è fondamentale la miscelazione dei liquidi contenuti nei contenitori con le urine. È evidente che la diuresi totale delle 24 ore è rappresentata dalla somma dei volumi raccolti nei due contenitori (se la divisione delle aliquote è stata ben fatta, sarà sufficiente moltiplicare per 2 il volume di urina contenuto in una delle due bottiglie). Viene inoltre richiesta una raccolta di urine della mattina (urine a digiuno: minzione successiva a quella delle 24 ore e raccolta prima di colazione) (26). Nella Tabella 1 sono rappresentati i diversi analiti urinari misurati sulle urine della mattina e su quelle delle 24 ore.

La preparazione dei campioni di ossalato si effettua diluendo 1 mL di urina con 1 mL di tampone EDTA pH 7,0. Si controlla il relativo pH ed eventualmente lo si corregge con HCl 1N o con NaOH 1N fino ad ottenere un valore compreso tra 5,0 e 7,0 . Si versa questa miscela in un tubo di purificazione contenente carbone attivo. Si agita per 5 minuti tramite vortex e poi si centrifuga. Il sovranatante raccolto contenente ossalato è stabile a 4 °C per almeno dieci giorni.

Tabella 1
Tipologia di raccolte urinarie e analiti da determinare

Urina del mattino	Urina 24 ore (Clorexidina)	Urina 24 ore (Acido Cloridrico)
Calcio	Urea	Calcio
Creatinina	Ammonio	Fosforo
	Sodio	Magnesio
	Potassio	Ossalati
	Cloro	Citrati
	Proteine	Solfati
	Acido Urico	Cistina
	Creatinina	
	pH	

FASE ANALITICA. ANALITI E METODI

Le misure della concentrazione urinaria di urea, sodio, potassio, cloro, proteine, acido urico, fosforo, magnesio, ammonio (previa diluizione 1:100 con acqua distillata), calcio e creatinina possono essere effettuate su un analizzatore automatico utilizzato per la grande routine (Cobas 6000 Roche Diagnostics nella nostra realtà) mentre ossalati, citrati, solfati e cistina, che non fanno parte dei misurandi comunemente analizzati in laboratorio, richiedono modalità analitiche particolari che sono illustrate qui di seguito.

Determinazione degli ossalati urinari

Per la misura degli ossalati urinari sono possibili vari approcci basati su cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (27) o metodi fotometrici enzimatici. Il principio su cui si basano questi ultimi è l'ossidazione dell'ossalato con formazione di acqua ossigenata e successiva rilevazione secondo Trinder. Nel nostro laboratorio questo metodo della ditta BSN (Biological Sales Network, Italia) è implementato su analizzatore Viva E (Siemens Helthyneers, Milano) (28-30).

Determinazione dei citrati urinari

Anche in questo caso sono possibili due approcci diversi: HPLC (31) o metodo fotometrico. Questo si basa sul consumo di NADH, con lettura a 340 nm, così come evidenziato nello schema di reazione di Figura 1. Nel nostro laboratorio questo metodo della ditta BSN è adattato su analizzatore Viva E (32,33).

Determinazione dei solfati urinari

Il metodo più comunemente utilizzato è basato sulla cromatografia a scambio ionico (34), in alternativa è possibile la misura fotometrica basata sulla formazione di un precipitato di solfato di bario evidenziato alla lunghezza d'onda di 436 nm (30,34-36).

Determinazione della cistina

Il metodo di scelta è HPLC (37,38); è però possibile la misura con metodo fotometrico. In ambiente acido (tampone acetato), un opportuno riducente (solfito di sodio) rompe i legami disolfuro della cistina per dare luogo alla formazione di tioli della cisteina che reagiscono con acido fosfotungstico. Questa reazione però non è specifica per cistina ma anche per acido urico, acido ascorbico ed altri disolfuri (Figura 2). Un bianco campione (Figura 3), eseguito con i reagenti sopra citati ed cloruro mercurico aggiunto al tampone acetato, è in grado di misurare l'assorbanza totale sottratta del contributo della cistina (il cloruro mercurico blocca selettivamente i gruppi –SH delle cisteine liberate). La concentrazione di cistina si ottiene quindi sottraendo il valore del bianco campione a quello del campione totale (39-45).

FASE POST-ANALITICA. REFERTAZIONE

La refertazione della cistinuria

Il valore di cistinuria viene espresso in mg/L/die ma può essere anche rapportato alla creatinina (mg cistina/g creatinina/die): tale correzione consente di riscontrare positività anche in campioni urinari diluiti contenenti ridotte concentrazioni di cistina. Un rapporto cistina/creatinina superiore a 106 mg/g al giorno è da confermare in cromatografia (41).

La refertazione dello studio metabolico nefrolitiasico

Nella refertazione dello studio metabolico i parametri urinari vengono riferiti a valori soglia nelle 24 ore basati su un ampio consenso della letteratura (1) e non ad intervalli di riferimento (Tabella 2).

Grazie al software in Access da noi sviluppato (46, 47) è possibile refertare tutti gli analiti urinari misurati nelle 24 ore, nelle urine del mattino e le relative supersaturazioni di calcio ossalato (SSR CaOx), calcio

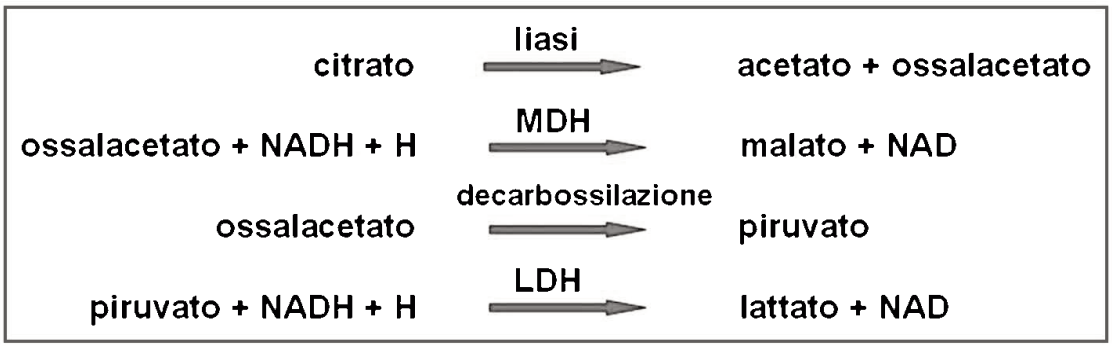


Figura 1
Schema di reazione per la determinazione dei citrati. MDH, malato deidrogenasi; LDH, lattato deidrogenasi.

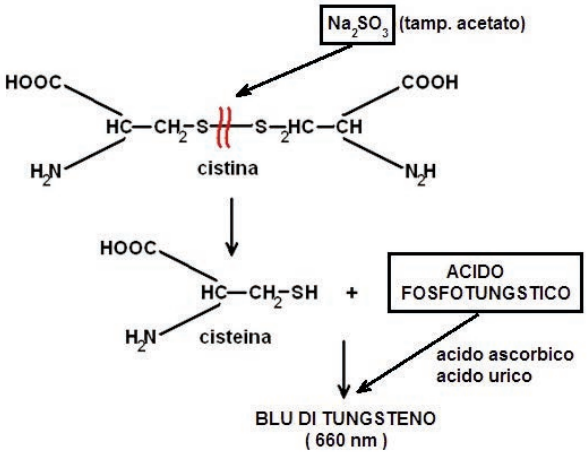


Figura 2
Misura della cistinuria: schema della reazione totale

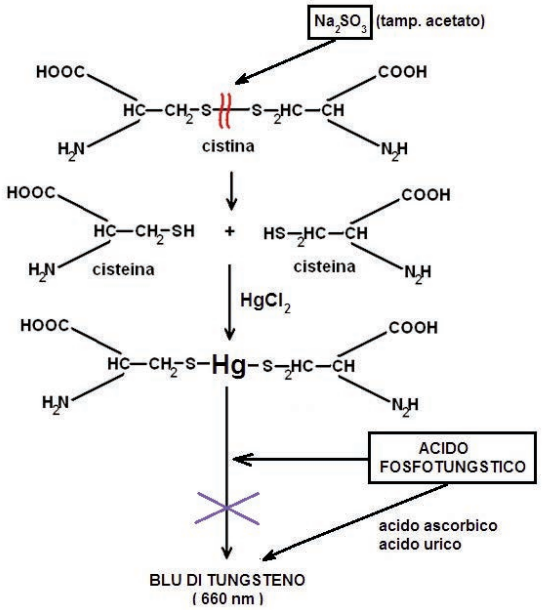


Figura 3
Misura della cistinuria: schema della reazione del bianco

Tabella 2
Intervalli di riferimento e limiti decisionali per calcolosi dei più comuni analiti urinari.

	Intervallo di riferimento	Valori decisionali per calcolosi
Calcio (mg/24h)	100 – 231	≤200
Magnesio (mg/24h)	24 – 255	≥60
Potassio (mmol/24h)	16 – 123	≥75
Sodio (mmol/24h)	43 – 217	≤152
Cloro (mmol/24h)	110 – 250	≤180
Fosforo (mg/24h)	40 – 1300	≤1100
Acido Urico (mg/24h)	200 – 1300	≤700
Ossalati (mmol/24h)	0,11 – 0,45	≤0,39
Citrati (mg/24h)	320 – 1260	≥640
Solfati (mg/24h)	300 – 3500	≤2000

fosfato monoacido (SSR Ca HPO4), acido urico (SSR UA) e cistina (SSR Cys). I valori patologici sono evidenziati in grassetto nell'esempio di referto illustrato in Figura 4. Viene riportato anche un istogramma in cui sono raggruppati i parametri metabolici, ambientali e le supersaturazioni. Le colonne superiori dell'istogramma, colorate in rosso, rappresentano i valori patologici. In questo specifico referto è presente inoltre un commento finale: si evidenzia infatti una ipercalciuria (518 mg/die) di natura metabolica (rapporto Ca/Crea 0,32), ipernatriuria, proteinuria, carenza degli inibitori della calcolosi calcica (potassio 47 mmol/die e citrati 222 mg/die), aumento dei solfati (proteine animali) e della acidità urinaria (pH 5,3). Un commento finale di questo tipo, fornito dal laboratorio, può sicuramente dare ulteriori indicazioni al clinico e/o al nefrologo per gli opportuni provvedimenti alimentari e/o farmacologici da intraprendere.

REGIONE CAMPANIA
ASL NAPOLI 1 CENTRO - P.O. DEI PELLEGRINI
U.O.C. LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA
Direttore: Dr. Antonio Sarappa

ID: 1333 Cognome nome: sesso: M data_nascita:
prel. del: 22/05/2017 proven.: ESTERNI TERR. grafico n. 9910 cc: codice_INFMED 50660

STUDIO METABOLICO PER RISCHIO NEFRO-LITIASICO

Dosaggi urinari delle 24 ore

Analita	risultato	unità	riferimento
Calcio (Ca)	**518**	mg/24h	<= 200
Magnesio (Mg)	118	mg/24h	=> 60
Sodio (Na)	**247**	mmol/24h	<= 152
Potassio	**47**	mmol/24h	=> 75
Ammonio	32	mmol/24h	<= 35
Ossalato (Ox)	0,27	mmol/24h	<= 0,39
Citrato (Cit)	**222**	mg/24h	=> 640
Fosfato (PO4)	**1180**	mg/24h	<= 1100
Solfato (SO4)	**3095**	mg/24h	<= 2000
Cloro	**214**	mmol/24h	<= 180
Acido urico (UA)	553	mg/24h	<= 700
Cistina	70	mg/24h	<= 150
Cistina/creatinina	0,018	mmol/mmol	<= 0,050
Creatinina	1773	mg/24h	<= 1500
Volume (VU)	2,5	Litri	=> 2,0
pH	5,3		

Altri dosaggi urinari delle 24 ore

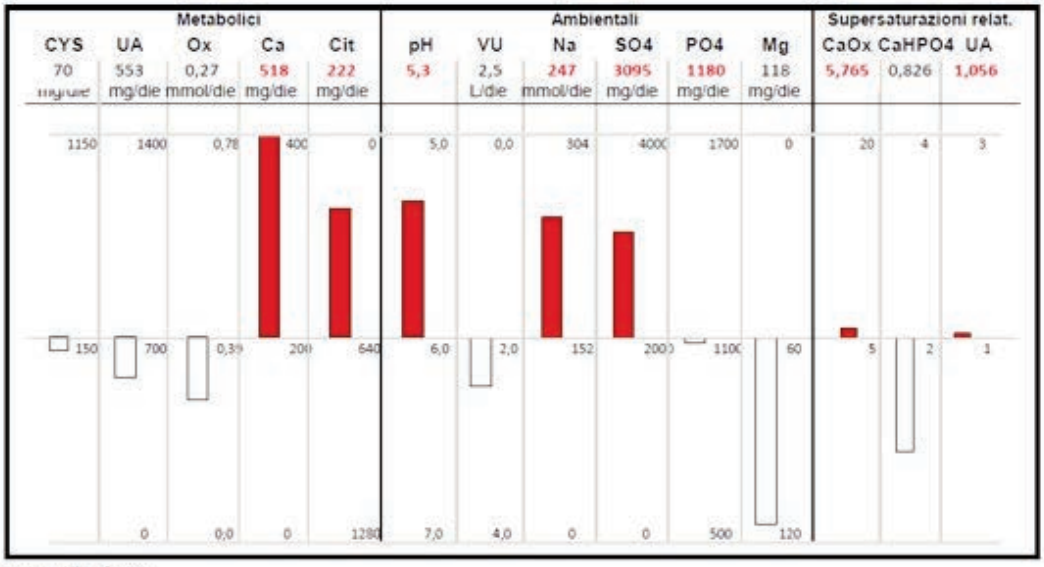
Analita	risultato	unità	riferimento
Proteine	**1,679**	g/24h	<= 0,150
Urea	35	g/24h	10 - 35

Supersaturazioni relative

Analita	risultato	riferimento
Calcio Ossalato (CaOx)	**5,765**	<= 5
Calcio fosfato acido (CaHPO4)	0,826	<= 2
Acido Urico (UA)	**1,056**	<= 1
Cistina (CIS)	0,082	<= 0,321

Dosaggi urinari della mattina

Analita	risultato	unità	riferimento
Calcio	18,3	mg/dL	6,8 - 21,3
Creatinina	56,8	mg/dL	=>30
Calcio/Creatinina	**0,32**	mg/mg	<= 0,11



Commento al referto:
Ipercalciuria metabolica, ipernatriuria, proteinuria e carenza di inibitori della calcolosi calcica (potassio e citrati). Aumento dei solfati (proteine animali) e della acidità urinaria. Possibile formazione di calcoli di calcio ossalato ed acido urico.

Napoli li, 23/09/2017 Dirigente

Figura 4
Esempio di referto sullo studio metabolico nefrolitiasico

CONCLUSIONI

Una adeguata formazione del personale di laboratorio e l'uso di semplici kit per la raccolta urinaria, preparati periodicamente dagli stessi operatori, facilita notevolmente l'approccio al paziente affetto da calcolosi renale senza gravare particolarmente sul lavoro routinario e d'urgenza.

Rispetto alle complesse tecniche cromatografiche di riferimento (HPLC e cromatografia a scambio ionico), le determinazioni fotometriche di ossalati, citrati, solfati e cistina da noi proposte ed adattate su comuni analizzatori biochimici (nel nostro caso Viva E della ditta Siemens Healthyneers, Milano), sono facilmente eseguibili in tempi brevi ed a costi estremamente ridotti.

Le sedute di lavoro possono avere cadenza settimanale per gli analiti urinari sopra citati, mentre le altre determinazioni si praticano entro le 24 ore dall'arrivo del campione così come la misurazione del volume urinario, la rilevazione potenziometrica del pH e la purificazione del campione per la determinazione dell'ossalato.

Lo studio metabolico si effettua sia per la valutazione di pazienti al primo episodio di calcolosi (si misurano tutti gli analiti urinari, compresa la cistina) ma principalmente per il monitoraggio dei pazienti in terapia al fine di prevenire le recidive litiasiche (uno o due controlli all'anno). Le sempre più numerose richieste dell'indagine afferenti al nostro Laboratorio sono dovute sicuramente alla notevole utilità clinica, al suo costo abbastanza contenuto (circa una cinquantina di euro) ed ai tempi di consegna sufficientemente ragionevoli (circa una settimana).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Marangella M, Petrarulo M, Daniele PG et al. LithoRisk: software per il calcolo e la visualizzazione dei profili di rischio di calcolosi renale. G Ital Nefrol 2002;6:693-8.
2. Trinchieri A, Coppi F, Montanari E et al. Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. Eur Urol 2000;37:23-25.
3. Rossano R, Apicella L, Capuano M et al. Nutrizione, stile di vita e nefrolitiasi. Atti del XII Congresso Sezione Campano-Siciliana SIN – Nefrologia tra passato presente e futuro. Ed. Cuzzolin, 2011:197.
4. Daudon M, Traxer O, Conort P et al. Type 2 diabetes increases the risk for uric acid stones. J Am Soc Nephrol 2006;17:2026-33.
5. Daudon M, Lacour B, Jungers P. Influence of body size on urinary stone composition in men and women. Urol Res 2006;34:193-9.
6. Cameron MA, Maalouf NM, Adams-Huet B et al. Urine composition in Type 2 diabetes: predisposition to uric acid nephrolithiasis. J Am Soc Neph 2006;17:1422-8.
7. Maalouf NM, Cameron MA, Moe OW et al. Low urine pH: a novel feature of the metabolic syndrome. Clin J Am Soc Nephrol 2007;2:883-8.
8. Gruppo di Studio Multidisciplinare per la Calcolosi Renale, Croppi E, Cupisti A, Lombardi M et al. Diagnostic and therapeutic approach in patients with urinary calculi. G Ital Nefrol 2010;27:282-9.
9. Capria M. La calcolosi delle vie urinarie. In: Andreucci V, Fuiano G, Conte G, Malattie dei reni. Napoli: Ed., Idelson – Gnocchi, 2004:127.
10. Taylor E, Curhan GC. Diet and fluid prescription in stone disease. Kidney Int 2006;70:835-9.
11. Borghi L, Schianchi T, Meschi T. et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. N Engl J Med 2002;346:77-84.
12. Taylor EN, Curhan GC. Demographic, dietary and urinary factors and 24h urinary calcium excretion. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:1980-7.
13. Lemann J Jr. Composition of the diet and calcium kidney stone. N Engl J Med 1993;328:880-1.
14. Tiselius HG, Alken P, Buck C et al. EAU Guidelines on Urolithiasis Edition, 2008. https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Urolithiasis-2008.pdf (ultimo accesso maggio 2018).
15. Nouvenne A, Meschi T, Prati B et al. Effects of a low-salt dieta on idiopathic hypercalciuria in calcium-oxalate stone formers: a 3-mo randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2010;91:565-70.
16. Borghi L, Schianchi T, Meschi T et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. N Engl J Med 2002;346:77-84.
17. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in human. J. Nutr 2003;133:855S-61S.
18. Holmes RP, Assimos DG The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. Urol Res 2004;32:311-6.
19. Mittal RD, Kumar R Gut inhabiting bacterium Oxalobacter formigens: role in calcium oxalate urolithiasis. J Endourol 2004;18:418-24.
20. Borghi L, Meschi T, Amato F, et al. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. J Urol 1996;155:839-43.
21. Asplin JR, Coe FL. Hyperoxaluria in kidney stone formers treated with modern bariatric surgery. J Urol 2007;177:565-9.
22. Yü TF. Urolithiasis in hyperuricemia and gout. J Urol, 1981;126:424-30.
23. Hiatt RA, Dales LG, Friedman GD et al. Frequency of urolithiasis in a prepaid medical care program. Am J Epidemiol 1982;115:255-6.
24. Rendina D, Mossetti G, De Filippo G et al. Association between metabolic syndrome and nephrolithiasis in an in-patient population in Southern Italy: role of gender, hypertension and obesity. Nephrol Dial Transplant 2009;24:900-6.
25. Bandinelli R, Pasquinelli F. Calcio, Fosfati, Magnesio. Diagnostica e tecniche di laboratorio. Chimica Clinica. Ed. Rosini Firenze 1979;26:1067.
26. Caudarella R. Ipercalciuria idiopatica. L'Endocrinologo 2007;8:209-20.
27. Jerez E, de la Piedra C, Traba ML. Determination of oxalic acid in urine by high-performance liquid chromatography. Rev Esp Fisiol. 1986;42:37-43.
28. Cangiano G, Buccino G, Errico A et al. Determinazione delle componenti di un calcolo urinario: nuovi accorgimenti metodologici ed informatici. Biochim Clin 2016;40SS:S151.
29. Cangiano G, Latte A, Russo M et al. Dosaggio degli ossalati urinari su AU 400 Olympus. Biochim Clin 2010;34:536.

30. Cangiano G, Latte A, Di Maina E et al. Determinazione dei solfati e degli ossalati urinari: ulteriori accorgimenti metodologici. Biochim Clin 2012;36:498.
31. Khaskhali M.H., Iqbal B, Khand FD. Simultaneous determination of oxalic and citric acids in urine by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed. Appl 1996;675,147-51.
32. Latte A, Cangiano G, Russo M et al. Determinazione dei citrati urinari su AU 400 Olympus. Biochim Clin 2009;33:488.
33. Cangiano G, Russo M, Forte F et al. Determinazione fotometriche automatizzate di citrato ed ossalato urinario. Biologi Italiani 2010;5/6:21-5.
34. Politi L, Chiaraluce R, Consalvi V et Al. Oxalate, phosphate and sulphate determination in serum and urine by ion chromatography. Clin Chim Acta 1989;184:155-65.
35. Latte A, Cangiano G, Russo M et al. Dosaggio fotometrico dei solfati urinari. Biochim Clin 2006;30:398.
36. Latte A, Cangiano G, Russo M et al. Dosaggio dei solfati urinari su AU600 Olympus Biochim Clin 2007;31:509.
37. Livesey JF, Donelly JG, Ooi DS. HPLC screening method for cystinuria. Clin Chem 1996;42:1714-6.
38. Fermo I, Arcelloni C, Paroni R. HPLC screening method for cystine in urine. Anal Biochem 2002;307:181-3.
39. Latte A, Cangiano G, Russo M et al. Screening della cistinuria (metodo al fosfotungstato) su AU600 Olympus e proposta di intervalli di riferimento. Biochim Clin 2005;29:268.
40. Cangiano G, Latte A, Russo M et al. Determinazione fotometrica della cistinuria. Biochim Clin 2007;31:267-71.
41 Latte A, Cangiano G, Russo M et al. Determinazione del rapporto cistina/creatinina su AU400 Olympus. Biochim Clin 2007;31:523.
42. Cangiano G, Latte A, Russo M et al. Dosaggio al fosfotungstato di valori elevati di cistinuria. Biochim Clin 2009;33:491.
43. Cangiano G, Latte A, Di Maina E et al. Ossaluria e cistinuria: dosaggi fotometrici “difficili”. ma non troppo. Esperienza di un quinquennio e nuove prospettive. Atti del XII Congresso Sezione Campano-Siciliana. Società Italiana di Nefrologia, 2011:45-9.
44. Cangiano G, Di Maina E, Buccino G et al. Ottimizzazione del dosaggio fotometrico della cistinuria. Biochim Clin 2013;37:550.
45. Cangiano G, Paradisone C, Di Maina E et al. Cistinuria al fosfotungstato. Nuovo dosaggio fotometrico a tre reagenti. Biochim Clin 2014;38:460.
46. Cangiano G, Latte A, Di Maina E et al. Studio metabolico della calcolosi urinaria su Viva Vitalab. 43° Congresso SIBioC 2011 Parma comunicazione n 92.
47. Cangiano G, Latte A, Di Maina E et al. Informatizzazione di laboratorio del rischio nefrolitiasico. Biochim Clin 2012;36:602.

Medicina di laboratorio e Medicina d'urgenza: un connubio indissolubile

Giuseppe Lippi[1], **Fiamma Balboni**[2], **Laura Bonfanti**[3], **Paolo Carraro**[4], **Mario Cavazza**[5], **Daniele Coen**[6], **Giorgio Da Rin**[7], **Roberto Lerza**[8], **Carmelo Madia**[9], **Martina Montagnana**[1], **Ciro Paolillo**[10], **Giulia Sancesario**[11], **Lorenza Zardo**[12], **Gianfranco Cervellin**[3]

[1]Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona
[2]Laboratorio Analisi, Istituto Fiorentino Cura e Assistenza IFCA, Firenze
[3]Unità Operativa Complessa di Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza, Dipartimento Provinciale Interaziendale Emergenza-Urgenza, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma
[4]Medicina di Laboratorio, Ospedale dell'Angelo, Azienda ULSS 3 Serenissima, Mestre, Venezia
[5]Medicina d'Urgenza e Pronto Soccorso-Dipartimento dell'Emergenza-Urgenza, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna
[6]Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano
[7]Medicina di Laboratorio, AULSS 7 Pedemontana, Bassano del Grappa, Vicenza
[8]Struttura Complessa di Pronto Soccorso e Medicina d'urgenza Ospedale San Paolo, Savona
[9]Medicina D'Urgenza e Pronto Soccorso, Ospedale Ca' Foncello, ULSS 2 Marca Trevigiana, Treviso
[10]Pronto Soccorso, Spedali Civili di Brescia
[11]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università di Roma Tor Vergata e Dipartimento di Neurologia Clinica e Comportamentale, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma
[12]Laboratorio Analisi, Ospedale S. Giacomo di Castelfranco V.to (TV), ULSS 2 Marca Trevigiana, Castelfranco V.to, Treviso

ABSTRACT

Laboratory Medicine and Emergency Medicine: an essential partnership. A better understanding of the pathophysiological bases of many pathologies, along with the considerable technological advances occurred over last few years, have allowed to broaden number and complexity of *in vitro* diagnostic tests. The emergency department is the clinical setting with the highest risk of forensic disputes, and this explains the inclination that many emergency physicians have towards defensive medicine. Disproportionate request of laboratory tests, with poor awareness on the impact of inappropriateness, is one of the leading negative aftermath of this attitude. The predictable consequences are economic, but also encompass the risk of generating direct damage to the patients, especially in the presence of false positive test results. Since diagnostic appropriateness represents an essential element for patient safety and for sustainability of the National Healthcare System, the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) and the Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) have organized a joint meeting entitled "Laboratory Medicine and Emergency Medicine: an essential partnership", of which this document is a summary. The issues that have been discussed represent major diagnostic dilemmas faced by emergency physicians, and for which the contribution of laboratory medicine may be decisive. These include acute systemic infections, acute abdominal pain, acute chest pain, head injury and acute bleeding. Since timely transmission of test results is an additional critical element for the clinical decision making in emergency settings, the document will also include considerations on sample transportation from the emergency room to the laboratory.

IL RAZIONALE PER LA PRESCRIZIONE DI ESAMI IN URGENZA

Alla diagnostica di laboratorio è talora attribuito un potere illimitato, quasi divino. La progressiva comprensione delle basi fisiopatologiche di molte patologie, congiuntamente ai rilevanti progressi tecnologici occorsi negli ulti anni, hanno consentito di espandere sostanzialmente numero e complessità dei test diagnostici *in vitro* (1,2). Il razionale alla base dell'appropriatezza prescrittiva non ricade solamente nel prevedibile risparmio economico, quanto nella prevenzione dei tanto temuti falsi positivi. Il numero di falsi positivi imputabili ad errori diagnostici è marginale,

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Piazzale L.A. Scuro 10, 37134, Verona. E-mail: giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 11.07.2018 Revisionato: 25.07.2018 Accettato: 25.07.2018

Pubblicato on-line: 04.09.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.050

sostanzialmente inferiore al 5% (1). La probabilità più concreta di generare falsi positivi risiede invece nel processo che porta alla definizione degli intervalli di riferimento per gli esami di laboratorio, ed alla generazione di allarmi inclusi nel referto, allo scopo di contraddistinguere ed evidenziare risultati anomali (2). Proprio da questa ambigua e sostanzialmente ingiustificata assimilazione (riferimento non equivale a normalità, così come anomalo non è sinonimo di patologico), scaturisce il rischio di etichettare come potenzialmente malato un soggetto che invece non lo è. Non esiste infatti un singolo esame di laboratorio in grado di confermare o escludere una determinata patologia con efficienza diagnostica che raggiunga sempre il 100% (1,2).

Il Pronto Soccorso (PS) è uno degli ambiti assistenziali a più elevato rischio di contenzioso medico-legale, e da ciò scaturisce un certo atteggiamento difensivistico dei Medici d'Urgenza (3). Una delle principali conseguenze è l'eccessivo ricorso a esami di laboratorio, sovente senza consapevolezza delle potenziali conseguenze negative legate all'inappropriatezza (4). Conseguenze che non sono solo economiche, ma che comportano talora il rischio di generare un danno diretto al paziente (5). Si ritiene pertanto che la prescrizione di pannelli predefiniti di esami, indipendenti dalla probabilità a priori di malattia del paziente, siano una delle azioni più negative che si possano attuare in PS. Molte decisioni cliniche devono essere prese bilanciando il rischio di sovraffollamento del PS, con la necessità di formulare una diagnosi più accurata e rapida possibile. L'atteggiamento migliore è sovente quello di riservare un certo lasso di tempo per osservare accuratamente il paziente, utilizzando gli esami di laboratorio in modo mirato, funzionale ad avvalorare un sospetto clinico (6).

Nella consapevolezza che una maggiore appropriatezza prescrittiva rappresenti un elemento essenziale per la sicurezza del paziente e per la sostenibilità del Sistema Sanitario Nazionale (SSN) (7,8), SIBioC e la "Academy of Emergency Medicine and Care" (AcEMC) hanno organizzato un evento congiunto, intitolato *Medicina di Laboratorio e Medicina d'Urgenza: un connubio indissolubile*, del quale il presente documento è una sintesi. Le tematiche affrontate rappresentano alcune delle maggiori sfide diagnostiche che i Medici d'Urgenza si trovano quotidianamente ad affrontare, e per le quali il contributo del laboratorio clinico può essere determinante (9) (Tabella 1). Esse comprendono pertanto le infezioni sistemiche acute, il dolore addominale acuto, il dolore toracico acuto, il trauma cranico e le emorragie acute. Poiché la tempestiva trasmissione dei risultati degli esami di laboratorio rappresenta un ulteriore elemento critico nel processo decisionale in medicina d'urgenza, il documento sarà corredato da considerazioni relative al trasporto dei campioni dal PS al laboratorio.

INFEZIONI SISTEMICHE ACUTE

La sepsi è una condizione la cui prognosi è strettamente tempo-dipendente. Il rischio di mortalità si riduce infatti sostanzialmente in funzione della precocità della terapia antibiotica. Analoghe considerazioni

Tabella 1
Biomarcatori diagnostici in Medicina d'Urgenza

Infezioni sistemiche acute
Procalcitonina
Proteina C Reattiva
Dolore addominale acuto
Lipasi
Proteina C reattiva, Conta leucocitaria
Acido lattico
Fosfatasi alcalina
Bilirubina
Gonadotropina corionica umana (nelle donne in età fertile)
Esame urine
Dolore toracico acuto
Troponina cardiaca I o T
Trauma cranico
Proteina S100B
Neurofilamenti
Ferritina
Emorragia acuta
Conta piastrinica
Tempo di protrombina, Tempo di tromboplastina parziale attivata
Fibrinogeno
Test di miscela
D-dimero/antitrombina
Test specifici per determinazione degli anticoagulanti orali diretti

valgono anche per la somministrazione precoce di liquidi e di sostanze ad azione vasopressoria. Per questa ragione, l'inquadramento clinico del paziente con infezione sistemica deve avvenire nel più breve tempo possibile. Le definizioni di sepsi e shock settico che si sono succedute nel tempo, rilevanti per gli studi epidemiologici e clinici, possono risultare complesse o confondenti per la clinica, alla luce del fatto che nessuna di esse (Sepsis-1, Sepsis-2 e Sepsis-3) considera aspetti fondamentali per la prognosi e per la scelta della terapia quali età, sito di infezione, indicazione chirurgica, disordini emostatici, immunodepressione. Anche la presenza o meno di shock, rilevante dal punto di vista prognostico, non modifica sostanzialmente l'impostazione terapeutica (10). Tanto la sepsi, quanto lo shock settico, vanno affrontati con aggressività terapeutica e monitoraggio intensivo. In ambedue i casi sono importanti la somministrazione precoce di antibiotici e la rimozione della fonte settica, nonostante la quantità di liquidi debba essere maggiore e l'impiego di vasopressori più frequente in caso di shock. Nella pratica, la storia clinica e l'obiettività, integrati da indagini ecografiche e/o radiologiche, sono sufficienti per diagnosticare un'infezione nella gran parte dei casi e per identificare gli elementi clinici utili per le scelte terapeutiche (sede di infezione, rimovibilità della fonte, quadro immunitario, presenza di shock).

Gli score clinici giocano un ruolo relativamente marginale nella gestione clinica del paziente settico, e appaiono invece utili per una stima del rischio di complicazioni e mortalità [ad esempio il "quick Sequential Organ Failure Assessment" (qSOFA)], o per valutare l'evoluzione nel tempo [ad es., il "Modified Early Warning Scoring" (MEWS)] (11). Per quanto riguarda il qSOFA score, proposto da Sepsis-3 per la valutazione in PS, giova ricordare che: la disfunzione d'organo può manifestarsi prima, contemporaneamente o dopo il riconoscimento dell'infezione, cosicché lo score necessita di essere ricalcolato nel tempo; non serve per porre diagnosi di sepsi ma per identificare pazienti a rischio più elevato di complicazioni o morte; ha elevata specificità, ma bassa sensibilità (serve per diagnosticare, non per escludere) e infine ha un valore predittivo per rischio di mortalità inferiore al MEWS (12).

La diagnosi di sepsi è estremamente complessa e si basa su segni e sintomi che hanno contorni assai sfumati. Fino al 40% dei pazienti con sepsi presenta esami colturali negativi il che, in combinazione con sintomi subdoli e sovente aspecifici, rendono la diagnosi complessa, soprattutto nelle fasi iniziali. Come detto, la sepsi è una patologia il cui esito è tempo-dipendente, giacché la tempestività diagnostica influenza sostanzialmente gli esiti, come testimoniato dal fatto che la mortalità per shock settico aumenta dell'8% per ogni ora di ritardo diagnostico. Ciò spiega la ricerca spasmodica per un biomarcatore ideale, che renda possibile diagnosticare la sepsi sin dalle fasi più precoci. Numerosi sono i biomarcatori proposti in questi anni, alcuni dei quali sono ormai da tempo entrati a pieno titolo nei percorsi diagnostici. Tra i più importanti giova ricordare la proteina C reattiva (PCR) e la procalcitonina (PCT), mentre altri sono ancora confinati alla fase di ricerca clinica (13). Per alcuni promettenti biomarcatori, come la presepsina, vi è ormai un certo numero di evidenze in letteratura, mentre per altri, come l'interleuchina 6, la lipopolysaccharide-binding protein o il CD64 dei neutrofili, solo per citarne alcuni, le evidenze sono ancora modeste e non sufficienti a supportarne l'introduzione nella pratica clinica (13). Molti di questi biomarcatori sono infatti ancora confinati ad ambiti di ricerca, soprattutto a causa delle metodiche manuali necessarie alla determinazione e dell'eccessivo tempo richiesto per l'esecuzione dell'esame, il che impedisce di fatto una rapida, accurata ed agevole introduzione in tutti i laboratori clinici. Alla luce delle evidenze recentemente emerse riguardo all'importanza clinica dell'utilizzo dei biomarcatori circolanti per la diagnosi e monitoraggio della sepsi, SIBioC ed AcEMC hanno condiviso la necessità di pubblicare un documento di consenso, allo scopo di rendere disponibili raccomandazioni pratiche in merito all'utilizzo dei biomarcatori per diagnosi di sepsi e per la gestione della terapia antibiotica in urgenza/emergenza (13). Il documento di consenso è stato redatto dopo identificazione da parte di entrambe le società scientifiche di otto membri ciascuna, ai quali è stato somministrato un questionario in cui era richiesto di analizzare alcune specifiche indicazioni relative all'utilizzo dei biomarcatori. Le raccomandazioni sono state quindi generate in conformità al programma nazionale per le linee guida (PNLG), utilizzando una classificazione basata sulla forza della raccomandazione, espressa in lettere decrescenti (da A ad E). A seguito dei consensi espressi, sono quindi scaturite tre indicazioni di grado A (fortemente raccomandate):

- modalità di richiesta del biomarcatore (sempre richiedibile in urgenza/emergenza);
- utilizzo clinico del biomarcatore (il risultato deve essere sempre interpretato in conformità alla clinica);
- tempistica di richiesta del biomarcatore (basata sulla cinetica).

Le sei indicazioni di grado B (raccomandazione suggerita) comprendono:

- utilità comprovata di alcuni biomarcatori nella diagnosi della sepsi;
- uso contestuale di PCT e PCR per aumentare la sensibilità diagnostica;
- possibilità di richiesta aperta al laboratorio;
- uso di soglie diagnostiche definite sulla base del valore predittivo negativo;
- uso di tecniche di analisi ad alta sensibilità;
- possibilità di utilizzare la determinazione della PCT per la gestione della terapia antibiotica.

L'uso di biomarcatori diversi da PCT e CRP è ad oggi ancora sconsigliato, fatta eccezione per la presepsina, per la quale permane tuttora una sostanziale incertezza (13).

DOLORE ADDOMINALE ACUTO

Il dolore addominale acuto rappresenta oggi il motivo più frequente di accesso al PS (corrisponde all'incirca al 5-10% di tutte le visite). Il più delle volte è di natura benigna, ma talvolta può essere sintomo di patologie molto serie, a volte mortali, il che rappresenta una dura sfida non solo per il Medico d'Urgenza, ma per tutto il Dipartimento d'Emergenza (14). Dopo un adeguato trattamento del dolore, la diagnosi differenziale è il momento centrale nella gestione di un paziente con dolore addominale acuto (15). Nonostante i grandi progressi delle tecniche di imaging, la storia e l'esame obiettivo rappresentano tuttora la chiave di volta per una corretta identificazione del quadro clinico. Un'accurata descrizione delle caratteristiche del dolore e dei sintomi correlati, l'anamnesi positiva per precedenti interventi chirurgici o procedure invasive e l'assunzione di farmaci, sono elementi determinanti nella valutazione complessiva del paziente. A volte la localizzazione del dolore è fortemente associata a patologie specifiche (ad esempio il dolore in ipocondrio destro è suggestivo di colecistite acuta), altre volte il dolore è aspecifico, come nel caso del dolore periombelicale o diffuso (16). L'età ed il sesso del paziente possono essere di grande ausilio nella valutazione di alcune patologie. Ad esempio l'aneurisma dell'aorta addominale è infrequente in pazienti con età inferiore a 50 anni, l'occlusione intestinale e le patologie a carico delle vie biliari sono tipiche del paziente anziano, cosi come l'ischemia intestinale. Un dolore addominale in una donna in età fertile può essere suggestivo di una gravidanza extrauterina. Analogamente alla storia clinica, l'esame obiettivo ha un ruolo determinante nell'ambito della diagnosi differenziale. L'ispezione dell'addome (alla ricerca di pregresse cicatrici), la palpazione (alla ricerca di segni di peritonite), insieme alla percussione ed alla auscultazione, possono raggiungere in mani esperte sensibilità e specificità paragonabili, se non superiori, a quella degli esami di laboratorio o delle tecniche di imaging (17). Per una migliore definizione del percorso diagnostico rimane fondamentale quindi la valutazione delle probabilità a priori, quanto più affidabile possibile. Solo successivamente, sulla base del quadro clinico che di volta in volta è stato sospettato, si può, se necessario, ricorrere al laboratorio e/o alla radiologia, allo scopo di accrescere sensibilità e specificità diagnostiche.

In linea generale, la valutazione della tipologia, intensità, modalità di insorgenza, localizzazione e irradiazione del dolore addominale può essere d'aiuto ad indirizzare l'ipotesi diagnostica e la conseguente richiesta appropriata di esami di laboratorio (18). Le indagini di laboratorio da effettuare dovrebbero infatti riflettere il sospetto clinico scaturito da anamnesi ed esame obiettivo, evitando esami non necessari e costosi, che possono invece confondere il quadro diagnostico. Gli esami eseguiti in prima battuta nel caso si sospetti una patologia infettiva e/o infiammatoria sono la determinazione della PCR e l'esecuzione di un esame emocromocitometrico con formula leucocitaria. La percentuale di polimorfonucleati è infatti generalmente aumentata in pazienti con patologie infiammatorie acute o in condizioni in cui sia presente necrosi tessutale, come ad esempio nello strozzamento intestinale. L'esame emocromocitometrico permette inoltre di evidenziare eventuali perdite ematiche (18).

Nel paziente con quadro clinico suggestivo di pancreatite acuta è raccomandata la determinazione di amilasi e/o lipasi. La lipasi presenta una sensibilità maggiore e rimane elevata per un maggiore periodo di tempo rispetto all'amilasi (19). I pazienti con pancreatite acuta presentano solitamente una concentrazione di lipasi tre volte superiore al limite superiore di riferimento. Nonostante non esista un biomarcatore sufficientemente sensibile e specifico per diagnosticare o escludere con certezza un'ischemia intestinale, l'acido lattico può essere di ausilio. Tra i biomarcatori più innovativi, le concentrazioni di D-lattato, dell'"intestinal-fatty-acid-binding protein" (I-FABP) e citrullina appaiono solitamente alterate in presenza di disfunzione della barriera intestinale, rappresentando pertanto dei buoni candidati per la diagnosi di ischemia intestinale acuta (20). La determinazione di aminotransferasi, fosfatasi alcalina e bilirubina può essere utile per escludere una colica biliare nei pazienti con dolore epigastrico o localizzato al quadrante superiore destro. L'esecuzione di un esame urine, soprattutto in età pediatrica e principalmente nel sesso femminile, è utile per escludere un'infezione del tratto urinario ed identificare un'eventuale ematuria. Infine, nelle donne in età fertile andrebbe sempre essere eseguita la determinazione della gonadotropina corionica umana (HCG) nel siero o nel plasma, al fine di escludere una gravidanza, anche ectopica (21).

DOLORE TORACICO ACUTO

Il dolore toracico acuto rappresenta una delle sfide più complesse per il Medico d'Urgenza, imputabile all'elevato numero di pazienti che si presentano al PS lamentando questo sintomo cardine (5-8% di tutti gli accessi) e alla potenziale estrema gravità di alcune delle sue cause. La maggior parte delle volte è di origine non-cardiaca (80%), mentre il 5,5% delle situazioni riconoscono un'origine che non mette a rischio imminente la vita del paziente. Il Medico d'Urgenza dovrà quindi effettuare un'accurata analisi del rischio, utilizzando nel modo migliore (secondo un paradigma di costo-efficacia) le risorse disponibili di primo livello (clinica, elettrocardiogramma, tecniche di imaging di base) e secondo livello (biomarcatori, tecniche di imaging avanzato, ecocardiografia), al fine di minimizzare le dimissioni inappropriate ed evitare un inaccettabile sovraffollamento dell'area di emergenza (22). L'integrazione tra alcuni elementi clinici e strumentali e la successiva analisi dell'esito dei pazienti ha portato a ipotizzare l'utilizzo di alcuni elementi composti in modo ponderato (score clinici) in grado di identificare popolazioni a rischio particolarmente basso da poter sottoporre con sicurezza a completa valutazione nell'area di emergenza, ed essere quindi dimessi con una possibilità di eventi avversi accettabile (tipicamente inferiore all'1%) (22).

Sono stati proposti ad oggi molti modelli (score), tra i quali l' "History, ECG, Age, Risk factors and Troponin" (HEART) e l'HEART modificato, l'"Emergency Department Assessment of Chest pain Score" (EDACS) e l'EDACS semplificato. Il "Two-hour Accelerated Diagnostic Protocol to Assess Patients with Chest Pain Symptoms Using Contemporary Troponins" (ADPT), l'"Alberta Stroke Program Early CT score" (ASPECT) e il "Troponin-only Manchester Acute Coronary Syndromes" (T-MACS), con valutazioni mirate alla sensibilità e specificità degli stessi nell'identificare al meglio il basso rischio, favorendo così la dimissione accelerata. Tra questi score, l'HEART modificato è apparso ad oggi il più affidabile (23). Un ulteriore e significativo miglioramento delle possibilità diagnostiche in area di emergenza, se da un lato verte sul perfezionamento degli strumenti diagnostici (biomarcatori, tecniche di imaging, ed altro) e sulle dimensioni delle popolazioni studiate, dovrà certamente avvalersi anche di sistemi esperti (ad esempio delle reti neurali) che, senza completamente sostituirsi al ragionamento clinico, potranno contribuire a migliorare sostanzialmente la gestione del paziente in urgenza/emergenza (24).

Nell'ambito specifico della diagnostica di laboratorio delle sindromi coronariche acute, è ormai universalmente riconosciuto come la determinazione delle troponine cardiache T ed I rappresenti il "gold standard", giacché l'efficienza diagnostica e la cinetica di questi biomarcatori ha ormai portato a ritenere obsoleto il ricorso ad altri esami, quali mioglobina e l'isoenzima MB della creatina kinasi (CK-MB) (25). Lo sviluppo e la successiva commercializzazione di metodi definiti ad alta sensibilità ha poi consentito di affinare ulteriormente l'efficienza della determinazione delle troponine cardiache nella diagnosi precoce e nella stratificazione del rischio a breve-medio termine (26). I paradigmi attuali per l'utilizzo clinico delle troponine ad alta sensibilità contemplano una determinazione all'ingresso (basale) ed una successiva ripetizione dell'esame, con esecuzione di prelievi seriali che, secondo i protocolli, possono prevedere prelievi seriati a 0-3-6 ore o 0-2-4 ore ("fast track"). La rivalutazione dei risultati prevede quindi il calcolo di un delta rispetto al valore del prelievo basale, che può essere basato su un valore incrementale in termini assoluti (cioè in ng/L) o sull'aumento percentuale (in genere superiore al 20% rispetto al valore precedente) (27). In merito alle soglie diagnostiche, è recentemente emersa la possibilità di sostituire il valore di troponina cardiaca al 99° percentile (calcolato in popolazione presumibilmente sana) con il limite di sensibilità funzionale del metodo (in genere rappresentata dal valore di troponina cardiaca T o I associato ad imprecisione analitica pari al 10%). Ciò consentirebbe di incrementare considerevolmente il valore predittivo negativo dell'esame all'accesso del paziente in PS, senza inficiare troppo il valore predittivo positivo, soprattutto utilizzando protocolli rapidi, che prevedono il secondo prelievo seriale a 2 ore (27,28).

TRAUMA CRANICO

Il danno cerebrale post-traumatico è la più comune causa di mortalità e disabilità trauma-correlata. Il trauma cranico che ne è alla base ha una epidemiologia molto variabile a seconda delle aree geografiche, della densità di popolazione e delle attività correlate. Nei paesi più industrializzati l'incidenza segue un andamento bimodale, con un picco in età giovanile ed uno negli anziani. Gli incidenti stradali, le cadute e contusioni accidentali (spesso in ambiente domestico), sono le cause più frequenti. Negli Stati Uniti, il trauma cranico è responsabile di circa 5 milioni di accessi ogni anno alle strutture di emergenza, cui segue circa il 10% di ricoveri (29). L'incidenza sui costi sanitari della diagnostica, delle complicanze, della degenza e degli esiti è facilmente intuibile. Clinicamente, seguendo la "Glasgow Coma Scale" (GCS), possono essere distinti traumi cranici gravi e moderati (GCS <8 e GCS 9-13, rispettivamente), che sono gravati da complicanze e mortalità significative, ma che incidono molto meno rispetto al trauma cranico minore (GCS 14-15), il quale ha complicanze possibili quasi esclusivamente in presenza di specifici fattori di rischio. I fattori di rischio sono stati standardizzati dalle linee guida italiane (30) che, sulla base del punteggio del GCS e la presenza di fattori preesistenti al trauma (abuso di alcol o farmaci e sostanze stupefacenti, età >65 anni, disordini emostatici, uso di anticoagulanti e antiaggreganti, epilessia) o successivi al trauma (perdita di coscienza, cefalea, vomito, dinamica maggiore, amnesia, convulsioni), selezionano i pazienti che devono essere sottoposti ad indagine neuroradiologica (solitamente tomografia assiale computerizzata [TAC] del cranio, senza mezzo di contrasto) onde escludere le rare ma possibili complicanze intracraniche. Su questo tipo di approccio non vi è univoco accordo nella letteratura internazionale, ma è indubbio che le linee guida italiane abbiano consentito una gestione chiara e sicura dei pazienti con trauma cranico minore (31). L'altra faccia della medaglia è però il fatto che la stragrande maggioranza delle TAC craniche risultano negative a fronte di costi non trascurabili e forse evitabili, ed all'esposizione a radiazioni. Emerge quindi oggi prepotentemente la necessità di individuare possibilità diagnostiche alternative alla TAC, che consentano una gestione del paziente altrettanto rapida e sicura, oltre che più conveniente sotto il profilo economico e radioprotezionistico.

Alla luce delle precedenti osservazioni, la definizione dell'entità del danno cerebrale conseguente ad un trauma cranico (TBI) è una sfida diagnostica spesso molto complessa, soprattutto nei casi di trauma cranico apparentemente lieve, in cui i sintomi clinici possono essere sfumati ma sottendere lesioni intracraniche severe. Le indagini strumentali, come la TAC, possono talvolta non essere sufficientemente sensibili per rilevare danni lievi ma diffusi (32). Riconoscere in modo tempestivo un danno cerebrale è spesso cruciale per l'esito del paziente. È quindi fondamentale la ricerca di

biomarcatori che consentano di identificare alterazioni neuropatologiche subcliniche e di supportare il percorso diagnostico.

Numerosi studi hanno evidenziato l'utilità diagnostica e prognostica di alcune proteine neuronali specifiche, sia nel sangue e sia nel liquido cefalo rachidiano (LCR), come ad esempio la proteina astrocitaria S100B, i neurofilamenti e la ferritina. I valori sierici di S100B sono un indice di danno neuronale acuto e di alterazione della barriera ematoencefalica. La proteina S100B ha una considerevole utilità prognostica ed un eccellente valore predittivo negativo, il che la rende un marcatore ideale nel percorso decisionale in merito alla successiva esecuzione di esami radiologici, anche nei traumi lievi (33,34). I neurofilamenti leggeri e pesanti (NF-L e NF-H) sono proteine strutturali assonali e riflettono la presenza di danno neuronale sia nelle malattie degenerative, come la sclerosi multipla, sia nel TBI. L'aumento di NF-L nel TBI è maggiore rispetto a quello di Tau, altro marcatore di alterazione neuronale. Sono stati recentemente sviluppati metodi ad alta sensibilità per la determinazione di entrambe le proteine nel sangue ("single molecule array", SIMOA), con risultati interessanti sotto il profilo diagnostico e degli esiti (35). Infine, i livelli sierici di ferritina, proteina di deposito intracellulare di ferro, aumentano nel TBI severo, mentre l'aumento nel LCR è dovuto a sanguinamento intratecale ed è un utile strumento di indagine nelle emorragie subaracnoidee con TAC negativa (36). Ad oggi non sono stati definiti metodi o biomarcatori di riferimento per la diagnosi di danni neuropatologici dovuti a trauma. Diverse molecole candidate sono promettenti biomarcatori e dimostrano una buona utilità diagnostica e prognostica. Altri studi multicentrici e su popolazioni indipendenti sono quindi necessari per la validazione e l'inclusione dei biomarcatori nel percorso diagnostico del TBI, nella consapevolezza che molti di essi possono difficilmente essere eseguibili in regime di urgenza/emergenza.

LE EMORRAGIE ACUTE

Il termine emorragia, che deriva dalle parole greche àima (sangue) e eraghìa" (rottura), sottende un processo patologico imputabile alla rottura di vasi sanguigni (tipicamente arterie e vene) con successiva fuoriuscita di sangue, la cui severità dipende dal tipo di vaso (più grave se coinvolge le arterie), dal calibro del vaso (più grave se i vasi colpiti sono di grosse dimensioni), dalla localizzazione (sovente le emorragie interne sono più complesse da gestire), dalle condizioni generali del paziente (ad esempio le emorragie sono più gravi in pazienti già anemici) e della possibile presenza di anomalie qualitative o quantitative dell'emostasi primaria (difetti di numero o funzione delle piastrine), emostasi secondaria (difetti di concentrazione o attività dei fattori della coagulazione) o della fibrinolisi (principalmente iperfibrinolisi) (37). Malgrado la fisiopatologia delle emorragie sia complessa ed eterogenea, l'elemento caratterizzante è pur sempre un trauma della parete vascolare, che comporta una soluzione di integrità del vaso ed il conseguente sanguinamento (38). Come detto, l'emorragia può essere favorita da una diatesi emorragica sottostante, sia essa iatrogena (farmaci anticoagulanti o antiaggreganti) o secondaria a disturbi della coagulazione (emofilia) o della crasi ematica (piastrinopenia, anemia emolitica) (39). Si riconoscono tipicamente quattro classi di gravità dell'emorragia, definiti sulla base dell'entità della perdita ematica (40). La I classe comporta una perdita <15% della massa circolante; clinicamente, la frequenza cardiaca è minimamente elevata o normale, non vi sono alterazioni della pressione arteriosa o della frequenza respiratoria, la diuresi è conservata. La II classe prevede un calo compreso tra 15-30% del volume ematico, con conseguenti agitazione, tachicardia, tachipnea. Nella III classe le perdite ematiche si attestano tra 30-40%; il paziente si presenta confuso, tachicardico, tachipnoico, ipoteso, oligurico. Infine, la IV classe definisce lo shock emorragico, con riduzione della massa circolante superiore al 40%; clinicamente si rilevano stato letargico, importante tachicardia (>140 battiti per minuto), ipotensione e anuria. La gestione dell'emorragia acuta prevede innanzitutto la stabilizzazione clinica del paziente, individuando la fonte emorragica e controllandola. A seconda della classe emorragica, può essere indicata l'infusione di fluidi e/o la trasfusione di sangue. Inoltre, se necessario, la correzione dell'eventuale disordine emostatico (40).

Malgrado la principale causa di emorragie acute e severe gestite nel PS riguardi sicuramente eventi traumatici gravi, che sovente non si manifestano in pazienti con difetti congeniti o acquisiti dell'emostasi, in alcuni pazienti esse possono presentarsi sotto forma di emorragie inattese, talora sostenute da eventi traumatici minori (in casi rarissimi anche apparentemente spontanee), che fanno sospettare la presenza di difetti coagulativi. In queste circostanze l'anamnesi, l'esame obiettivo e gli esami di laboratorio sono essenziali per indirizzare il ragionamento diagnostico (41). Gli esami che il laboratorio può offrire in urgenza sono per il clinico fonte di informazioni oggettive in merito ai meccanismi emostatici, che consentono di attivare rapidamente un accurato approccio terapeutico. Gli esami usati in emergenza devono essere rapidi, di facile esecuzione, sempre disponibili e altamente sensibili. Per la valutazione della capacità coagulativa del paziente, quelli che rispondono a questi requisiti sono la conta piastrinica (per valutare possibili anomalie dell'emostasi primaria) e gli esami di base della coagulazione, cioè tempo di protrombina (PT), tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) e fibrinogeno (per valutare possibili anomalie dell'emostasi secondaria) (42). A questi test possono aggiungersi eventualmente la determinazione di D-dimero ed antitrombina, utili alla diagnosi di coagulazione intravascolare disseminata (CID), patologia che aggiunge complicanze emorragiche conseguenti al consumo dei fattori della coagulazione, all'aspetto trombotico. Nel paziente emorragico in terapia anticoagulante è poi necessario valutare l'eventuale

attività del farmaco in circolo. Un sovradosaggio di farmaci anti-vitamina K (warfarin, acenocumaloro), e per analogia un difetto di assorbimento di vitamina K, si manifesta con un allungamento importante del PT, mentre un sovradosaggio di eparina non frazionata si manifesta con un allungamento importante dell'APTT. Per gli anticoagulanti orali diretti (DOAC) è invece essenziale il dosaggio dell'attività del farmaco mediante test specifici, quali il tempo di trombina diluito (dTT) per i farmaci anti-Fattore II attivato (FIIa), e la determinazione diretta dell'attività anti-Fattore X attivato (FXa) per i farmaci con attività diretta contro FXa (43). Nel paziente non in terapia anticoagulante in cui si riscontri un allungamento di PT, APTT o di entrambi, il test di miscela consente di orientare verso un difetto fattoriale oppure verso la presenza di un inibitore tempo/temperatura dipendente (44).

Fondamentale ricordare che il campione di coagulazione è fra i più sensibili alle modalità di raccolta e conservazione. Emolisi, volume scarso, presenza di coaguli, conservazione, stress da prelievo, contaminazione da infusione, possono influenzare profondamente i risultati (45). Appare quindi decisivo il ruolo del laboratorio nel valutare l'idoneità del campione e la presenza di interferenti che possono falsamente allungare/accorciare i tempi di coagulazioni, evitando così di produrre informazioni fuorvianti. Un'accurata anamnesi (anche mediante utilizzo dei cosiddetti "score emorragici") e la valutazione dei risultati degli esami eseguiti in urgenza, oltre al rapido e corretto approccio terapeutico, consentono quindi al laboratorio di programmare l'esecuzione di esami di secondo/terzo livello, idonei ad individuare le possibili cause dell'evento emorragico.

OPPORTUNITÀ PER IL TRASPORTO DEI CAMPIONI DAL PRONTO SOCCORSO AL LABORATORIO

Il contenimento del cosiddetto "turnaround time" (TAT) è una sfida aperta per la diagnostica d'urgenza in PS, giacché almeno il 20% del tempo complessivo è attribuibile alle fasi preanalitiche, che precedono l'arrivo dei campioni biologici in laboratorio. L'invio di campioni biologici al laboratorio è oggi possibile utilizzando sostanzialmente due modalità di trasporto (46). La prima, tipicamente manuale, è mediata da operatori che ciclicamente raccolgono i campioni prelevati e li recapitano (con trasporto pedonale o utilizzando veicoli); la seconda si basa invece su sistemi di posta pneumatica. Il flusso preanalitico in PS prevede fasi strettamente legate alla peculiarità clinica ed organizzativa (47). Si possono infatti riconoscere attività legate al prelievo, alla registrazione informatica, all'apposizione delle etichette, al parcheggio delle provette nell'area di spedizione, ed al tempo effettivo imputabile al trasporto. I sistemi di posta pneumatica consentono tempi più contenuti e ottimizzazione delle risorse umane. A questo proposito la letteratura è abbastanza ampia, e rivela alcune criticità relative a possibili microemolisi e scambi gassosi. In particolare, sono state evidenziate variazioni significative di alcuni analiti dopo il trasporto mediante sistemi di posta pneumatica. Le alterazioni più importanti riguardano soprattutto la pressione parziale dell'ossigeno (pO2) nell'ambito dell'emogasanalisi, la tromboelastometria, gli studi di funzionalità piastrinica, alcuni parametri biochimici tra i quali la lattato deidrogenasi (LDH) e, in qualche caso, il potassio (47). Queste alterazioni possono essere comunque contenute utilizzando uno specifico confezionamento che blocchi le provette all'interno dei bossoli, oppure mediante il contenimento della velocità e delle spinte laterali, limitando il sistema a percorsi meno estesi. Recentemente sono stati anche proposti sistemi monodirezionali, che consentono di inviare singole provette, non confezionate all'interno di bossoli, e che possono pertanto essere considerati una valida alternativa alla posta pneumatica tradizionale. La riduzione del TAT di queste fasi preanalitiche nello specifico contesto del PS è stata recentemente analizzata in dettaglio, grazie ad un'esperienza applicativa specifica, che ha potuto dimostrare anche l'utilità di ridefinire l'organizzazione di questa attività all'interno del reparto. Proprio in quest'ambito si possono ottenere i principali vantaggi operativi.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Mattiuzzi C. The biomarker paradigm: between diagnostic efficiency and clinical efficacy. Pol Arch Med Wewn 2015;125:282-8.
2. Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Biomarker validation in the emergency department. General criteria and clinical implications. Emerg Care J 2014;10:1860.
3. Cervellin G, Cavazza M. Defensive medicine in the emergency department. The clinicians' perspective. Emerg Care J 2016;12:5615.
4. Montagnana M, Lippi G. The risks of defensive (emergency) medicine. The laboratory perspective. Emerg Care J 2016;12:5581.
5. Li L, Georgiou A, Vecellio E, et al. The effect of laboratory testing on emergency department length of stay: a multihospital longitudinal study applying a cross-classified random-effect modeling approach. Acad Emerg Med 2015;22:38-46.
6. Lippi G, Cervellin G, Plebani M. The ten commandments of laboratory testing for emergency physicians. Clin Chem Lab Med 2014;52:183-7.
7. Lippi G, Bovo C, Ciaccio M. Inappropriateness in laboratory medicine: an elephant in the room? Ann Transl Med 2017;5:82.
8. Lippi G. Weighting healthcare efficiency against available resources: value is the goal. Diagnosis (Berl) 2018;5:39-40.
9. Lippi G, Panteghini M, Bernardini S, et al. Esami di laboratorio in Pronto Soccorso: una proposta di consenso SIBioC - Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care. Biochim Clin 2017;41:183-8.
10. Kalil AC, Sweeney DA. Should we manage all septic patients based on a single definition? An alternative approach. Crit Care Med 2018;46:177-80.
11. Churpek MM, Snyder A, Han X. Quick sepsis-related organ failure assessment, systemic inflammatory response

syndrome, and early warning scores for detecting clinical deterioration in infected patients outside the intensive care unit. Am J Resp Crit Care Med 2017;195:906-11.
12. Società Italiana Medicina d'Emergenza-Urgenza (SIMEU). La gestione della sepsi nell'adulto in Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza in Italia: le raccomandazioni della Consensus SIMEU. Sito Web: http://www.simeu.it/w/articoli/leggiArticolo/3821/leggi. Ultimo Accesso, Luglio 2018.
13. Lippi G, Montagnana M, Balboni F, et al. Documento di consenso SIBioC-Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) sull'utilizzo in Pronto Soccorso dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi batterica. Biochim Clin 2018;42:62-73.
14. Cervellin G, Mora R, Ticinesi A, et al. Epidemiology and outcomes of acute abdominal pain in a large urban Emergency Department: retrospective analysis of 5,340 cases. Ann Transl Med 2016;4:362.
15. Gans SL, Pols MA, Stoker J, et al. Guideline for the diagnostic pathway in patients with acute abdominal pain. Dig Surg 2015;32:23-31.
16. Gerhardt RT, Nelson BK, Keenan S, et al. Derivation of a clinical guideline for the assessment of nonspecific abdominal pain: the Guideline for Abdominal Pain in the ED Setting (GAPEDS) Phase 1 Study. Am J Emerg Med 2005;23:709-17.
17. McNamara R, Dean AJ. Approach to acute abdominal pain. Emerg Med Clin N Am 2011;29:159-73.
18. Cartwright SL, Knudson MP. Evaluation of acute abdominal pain in adults. Am Fam Physician 2008;77:971-8.
19. Lippi G, Valentino M, Cervellin G. Laboratory diagnosis of acute pancreatitis: in search of the Holy Grail. Crit Rev Clin Lab Sci 2012;49:18-31.
20. Peoc'h K, Nuzzo A, Guedj K, et al. Diagnosis biomarkers in acute intestinal ischemic injury: so close, yet so far. Clin Chem Lab Med 2018;56:373-85.
21. Cervellin G, Comelli I, Sartori E, et al. A four-year survey on unexpected pregnancy diagnoses in a large urban emergency department in Parma, Italy. Int J Gynaecol Obstet 2014;127:51-4.
22. Cervellin G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Diagnostic algorithms for acute coronary syndrome-is one better than another? Ann Transl Med 2016;4:193.
23. Backus BE, Six AJ, Kelder JH, et al. Risk scores for patients with chest pain: evaluation in the emergency department. Curr Cardiol Rev 2011;7:2-8.
24. Infante T, Forte E, Schiano C, et al. An integrated approach to coronary heart disease diagnosis and clinical management. Am J Transl Res 2017;9:3148-66.
25. Galli C, Lippi G. High-sensitivity cardiac troponin testing in routine practice: economic and organizational advantages. Ann Transl Med 2016;4:257.
26. Clerico A, Lippi G. The state-of-the-art of "high-sensitivity" immunoassay for measuring cardiac troponin I and T. J Lab Precis Med 2018;3:53.
27. Lippi G, Cervellin G, Sanchis-Gomar F. Critical appraisal to using relative or absolute cardiac troponins change for diagnosing acute myocardial infarction. J Lab Precis Med 2018;3:43.
28. Lippi G, Sanchis-Gomar F. "Ultra-sensitive" cardiac troponins: Requirements for effective implementation in clinical practice. Biochem Med (Zagreb), in stampa.
29. Holmes JF, Chang CH. Head injury. In: Wolfson AB ed. Harwood-Nuss' Clinical Practice of Emergency Medicine. Sixth edition. Philadelphia, USA: Wolsters Kluwer, 2015:151-7.
30. Rusticali B, Villani R, Beltramello A, et al. Trattamento del trauma cranico minore e severo: linee guida nazionali di riferimento. Agenzia per i servizi sanitari regionali (AGENAS), Roma, Italia. 2007.
31. Lippi G, Cervellin G. Diagnostic approach to the mild head trauma of the adult in Emergency Medicine: between biomarkers and imaging. Recenti Prog Med 2013;104:120-32.
32. Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, et al. Traumatic brain injuries. Nat Rev Dis Primers 2016;2:16084.
33. Cervellin G et al. Serum levels of protein S100B predict intracranial lesions in mild head injury. Clin Biochem 2012;45:408-11.
34. Cervellin G, Benatti M, Carbucicchio A,et al. Proteina S100B ed enolasi neurone-specifica nella valutazione iniziale del trauma cranico lieve nell'adulto: pronte per il debutto nel mondo reale? Biochim Clin 2014;38:227-33.
35. Shahim P, Gren M, Liman V, et al. Serum neurofilament light protein predicts clinical outcome in traumatic brain injury. Sci Rep 2016;6:36791.
36. Schirinzi T, Sancesario G, Anemona L, et al. CSF biomarkers in superficial siderosis: a new tool for diagnosis and evaluation of therapeutic efficacy of deferiprone--a case report. Neurol Sci 2014;35:1151-2.
37. Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. Methods Mol Biol 2017;1646:3-27.
38. Lippi G, Favaloro EJ, Cervellin G. Massive posttraumatic bleeding: epidemiology, causes, clinical features, and therapeutic management. Semin Thromb Hemost 2013;39:83-93.
39. Baue AE. Physiology of shock and injury. In: Gelder ER, ed.Shock and Resuscitation. New York: McGraw-Hill, 1993: pp. 67-125.
40. ATLS Subcommittee; American College of Surgeons' Committee on Trauma; International ATLS working group. Advanced trauma life support (ATLS®): the ninth edition. J Trauma Acute Care Surg 2013;74:1363-6.
41. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ. Diagnostics of Inherited Bleeding Disorders of Secondary Hemostasis: An Easy Guide for Routine Clinical Laboratories. Semin Thromb Hemost 2016;42:471-7.
42. Lippi G, Favaloro EJ. Laboratory hemostasis: from biology to the bench. Clin Chem Lab Med 2018;56:1035-45.
43. Cervellin G, Benatti M, Bonfanti L, et al. Quality and safety issues of direct oral anticoagulants in the emergency department. Semin Thromb Hemost 2015;41:348-54.
44. Poli G, Castiglioni P, Montagnana M, et al. Troubleshooting an isolate prolongation of activated partial thromboplastin time in a patient with acute myocardial infarction-a paradigmatic case report. Ann Transl Med 2016;4:426.
45. Lippi G, Favaloro EJ. Preanalytical issues in hemostasis and thrombosis testing. Methods Mol Biol 2017;1646:29-42.
46. Lippi G, Mattiuzzi C. Biological samples transportation by drones: ready for prime time? Ann Transl Med 2016;4:92.
47. Nybo M, Lund ME, Titlestad K, Maegaard CU. Blood sample transportation by pneumatic transportation systems: A systematic literature review. Clin Chem 2018;6:782-90.

Specifiche di qualità, terminologia e definizione dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T

Aldo Clerico[1], Martina Zaninotto[2], Maria Stella Graziani[3], Monica Mion[2], Silvia Masotti[1], Concetta Prontera[1], Marco Migliardi[4], Antonio Fortunato[5], Mario Plebani[2]

[1]Scuola Superiore Sant'Anna e Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio Pisa
[2]Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria, Padova
[3]Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona
[4]Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera, Ordine Mauriziano, Torino
[5]Patologia Clinica, Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche, Area Vasta 5, Ascoli Piceno

ABSTRACT

Quality specifications, terminology and definition of the methods for the measurement of cardiac troponins. All guidelines recommend that cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT) should be considered the preferred biomarkers for the differential diagnosis of acute coronary syndrome (ACS), and also that the 99th upper reference population limit value for cardiac troponins should be measured with an imprecision ≤10 CV%. However, only after the year 2006, some cTn methods showed analytical performances in accordance with the quality specifications required by guidelines. The cTn methods with the best analytical performances (currently named "high-sensitivity" methods) should be preferred for the early diagnosis of ACS and also for risk stratification of cardiovascular disease both in general population and cardiac patients. The most recent international guidelines recommend that two basic criteria are needed to define the characteristics required for cTn immunoassays in order to be defined as "high-sensitivity" methods. The first criterion is that the total imprecision (CV) at the 99th percentile value should be ≤10%. The second criterion is that these methods should measure cTn concentrations at least in 50% (and ideally >95%) of both healthy adult men and women with value above the assay's limit of detection. The aim of this SIBioC document is to discuss some critical aspects related to definition of "high-sensitivity" cTn methods, including: analytical performance, pathophysiological interpretations, and clinical relevance of "high-sensitivity" cTn assays with particular attention to routine practice of clinical laboratories in Italy, recommending the use of an accurate terminology to avoid the usage of potentially misleading terms.

INTRODUZIONE

Le troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) sono raccomandate come biomarcatori di prima scelta per la diagnosi differenziale della sindrome coronarica acuta (SCA) da tutte le linee guida nazionali e internazionali (1-11). Tuttavia, pochi sistemi immunometrici per la misura delle troponine cardiache sono al momento in grado di soddisfare le specifiche di qualità richieste dalle linee guida (1-11).

Scopo di questo documento è definire le specifiche di qualità e suggerire una classificazione dei metodi di misura delle cTnI e cTnT in accordo con le più recenti linee guida nazionali e internazionali (7-12). Considerando che nella letteratura si utilizzano differenti terminologie per definire e classificare i più recenti metodi di misura delle cTnI e cTnT, questo documento intende anche suggerire una terminologia univoca, derivata dalle linee guida internazionali, per classificare i più recenti metodi di misura di questi analiti, che sia utilizzabile nel contesto italiano della medicina di laboratorio, come pure nella pratica clinica.

Nella prima parte del documento sono riassunte e discusse le specifiche di qualità e le definizioni raccomandate dalle più recenti linee guida internazionali (9-12). In questa parte la terminologia originale inglese (non tradotta in italiano) sarà utilizzata per classificare e identificare i metodi, in modo da favorire la più completa armonizzazione con le linee guida.

Nella seconda parte del documento sono riportate e brevemente discusse alcune raccomandazioni che dovrebbero essere universalmente utilizzate nella pratica di laboratorio e clinica in Italia, in modo da ottenere un'armonizzazione della terminologia e della definizione delle prestazioni analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache, che siano in pieno

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

Ricevuto: 30.08.2018 Revisionato: 06.09.2018 Accettato: 06.09.2018

Pubblicato on-line: 11.10.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.062

accordo con le più recenti raccomandazioni (9-12). In questa seconda parte si suggerirà anche una trasposizione in italiano dei termini originali in lingua inglese al fine di ottenere anche un'armonizzazione dei termini tecnici da utilizzare per la classificazione dei metodi di misura delle troponine cardiache (Tabella 1).

METODI DI MISURA

Specifiche di qualità

Nell'anno 2000, le linee guida hanno stabilito per la prima volta che cTnI cTnT dovevano essere considerate come i biomarcatori di elezione per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA) (1). Queste linee guida hanno definito, inoltre, che la concentrazione di cTnI e cTnT, corrispondente al 99° percentile della popolazione di riferimento ("Upper Reference Limit", URL), doveva essere considerata come il valore soglia per la diagnosi di IMA (1). Infine, le stesse linee guida hanno stabilito che tale valore decisionale dovesse essere misurato con un errore, espresso come coefficiente di variazione (CV), uguale o inferiore al 10% (1). Negli anni successivi, tutte le linee guida nazionali e internazionali hanno sempre confermato queste raccomandazioni: cTnI e TnT sono da considerare i biomarcatori di elezione per la diagnosi di IMA, come valore decisionale deve essere considerato il 99° percentile della distribuzione di cTnI e cTnT nella popolazione di riferimento, e inoltre, questo parametro deve essere misurato con un CV ≤10% (2-11).

È evidente che queste specifiche di qualità di fatto assumono che siano presenti in circolo quantità misurabili di cTnI e cTnT anche nei soggetti apparentemente sani. Questa evidenza è stata però verificata sperimentalmente solo dopo l'anno 2005, quando sono stati messi a punto e resi disponibili per i laboratori clinici i primi sistemi immunometrici su piattaforme automatizzate con sensibilità analitica per cTnI e cTnT ≤10 ng/L (12-17).

Dal punto di vista metodologico è importante rilevare come la messa a punto di metodi che misurino il 99° percentile con un CV ≤10% sia una sfida molto difficile da vincere, in quanto tale valore può essere stimato entro un intervallo di concentrazioni 15-50 ng/L per la cTnI e mediamente di 14 ng/L per la cTnT, considerando i metodi più recenti attualmente disponibili (18-23). Calcoli teorici (14) ed evidenze sperimentali (15) indicano che è necessaria una sensibilità analitica di circa 1 ng/L perché un sistema immunometrico sia in grado di misurare i livelli circolanti di cTnI e cTnT nella maggior parte dei soggetti adulti apparentemente sani, specialmente se di sesso femminile. In questi ultimi anni, le aziende produttrici hanno reso disponibili metodi immunometrici per la misura delle troponine con prestazioni analitiche progressivamente migliori (12-17). Alcuni di questi metodi soddisfano le specifiche di qualità raccomandate come dimostrano i risultati ottenuti in studi di confronto che utilizzano protocolli standardizzati (18-22).

In accordo con Apple et al. (12), è necessario prendere in considerazione due fondamentali criteri per classificare i più recenti metodi immunometrici per la misura di cTnI e cTnT che presentano una più elevata sensibilità. Tali metodi sono definiti metodi "high-sensitivity" nelle linee guida internazionali più recenti (10-12). Il primo criterio, che è da considerare una *conditio sine qua non*, stabilisce che si devono definire test di laboratorio "high-sensitivity" per la misura delle cTnI e cTnT esclusivamente i sistemi immunometrici che sono in grado di misurare il 99° percentile con un CV ≤10%. Il secondo criterio stabilisce che i metodi "high-sensitivity" devono essere anche in grado di misurare i livelli circolanti superiori al limite di determinazione del metodo ("Limit of Detection", LoD) nella maggioranza dei soggetti adulti normali (10-12). Ancora più recentemente, il documento della "Academy of the American Association for Clinical Chemistry" e della "Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers" di IFCC, ha posto l'accento sul fatto che la popolazione di riferimento debba comprendere individui di entrambi i sessi e che un metodo "high-sensitivity" debba misurare valori di cTnI e cTnT nella maggior parte sia della popolazione femminile che maschile (10). È ben noto, infatti, che le donne adulte presentano livelli circolanti di cTnI e cTnT mediamente inferiori rispetto agli uomini di pari età, probabilmente perché hanno una massa corporea e quindi anche una massa miocardica più piccola (10,12-16). Alcuni Autori hanno proposto una classificazione in 4 livelli di sensibilità analitica sulla base della percentuale di soggetti sani che sono misurabili con i vari metodi (17). Infatti, alcuni dei più recenti metodi sono in grado di misurare i livelli circolanti di cTnI in una percentuale di soggetti normali (inclusa la popolazione pediatrica) significativamente superiore al 50% (cioè >80%) (18, 19).

Tabella 1
Terminologia utilizzata nel documento e traslazione dalla lingua inglese a quella italiana: riassunto delle raccomandazioni

Termine della letteratura Inglese	Termine da utilizzare nella lingua Italiana
99th percentile of reference population	99° percentile della popolazione di riferimento
Contemporary sensitivity method	Metodo non ad alta sensibilità (misura il 99° percentile della popolazione di riferimento con un CV >10% ma ≤20%).
High-sensitivity method	Metodo ad alta sensibilità (soddisfa le specifiche di qualità previste dalle linee guida)
Limit of Detection (LoD)	Limite di determinazione del metodo
Upper Reference Limit (URL)	Limite superiore di riferimento

In accordo con tutte le più recenti linee guida nazionali ed internazionali (3, 7-10), i metodi che misurano il 99° percentile con un CV <20% (ma >10%) si possono ancora utilizzare nella pratica clinica, ma non si dovrebbero definire come "high-sensitivity". Tali metodi sono definiti dalla letteratura in lingua inglese come "contemporary sensitive". I metodi che invece misurano il 99° percentile con un CV >20% non dovrebbero più essere utilizzati per la diagnosi di IMA (3, 7). In quest'ultima categoria rientrano quasi tutti i metodi di "point of care testing" (POCT), che possono essere utilizzati per un primo screening al letto del paziente, in ambulanza o nei centri di pronto soccorso periferici che non dispongono di un laboratorio clinico. Questi metodi sono pertanto utilizzabili per evidenziare i pazienti ad alto rischio di IMA, per avviarli il più velocemente possibile a un reparto clinico specializzato in grado di effettuare con urgenza un intervento coronarico invasivo, come raccomandato dalle più recenti linee guida internazionali (9).

RACCOMANDAZIONI

Terminologia

1. Si raccomanda di utilizzare, nel contesto della medicina di laboratorio e della pratica clinica in Italia, solamente il termine metodi "ad alta sensibilità" come corrispettivo di "high-sensitivity methods", che è utilizzato dalle linee guida internazionali per indicare i metodi che soddisfano entrambi i criteri riguardanti le specifiche di qualità raccomandati dalle più recenti linee guida (10).
2. Si raccomanda inoltre di definire "non ad alta sensibilità" tutti i metodi di cTnI e cTnT, che misurano il 99° percentile con un CV >10% ma ≤20%. La letteratura internazionale utilizza attualmente il termine "contemporary sensitivity" per definire questi metodi (9-12). L'utilizzo del termine italiano "metodi con sensibilità contemporanea" potrebbe risultare ambiguo per definire questi metodi, in quanto è in corso un rapido passaggio nei laboratori italiani a metodi "ad alta sensibilità". Quindi si presume che nei prossimi mesi la maggior parte dei metodi utilizzati nei laboratori clinici italiani saranno "ad alta sensibilità" e quindi il termine "sensibilità contemporanea" diventerà equivoco e obsoleto. È importante sottolineare che il termine metodi "ad alta sensibilità" non dovrebbe essere utilizzato per definire i metodi che misurano il 99° percentile con un CV ≤10%, ma che, tuttavia, non sono in grado di misurare livelli circolanti di cTnI o cTnT nella maggioranza di individui adulti che compongono una popolazione di riferimento costituita da sole donne o da soli uomini (10).
3. Si raccomanda di NON utilizzare il termine "ultrasensibile" per definire un metodo per la misura delle troponine cardiache, in quanto tale termine può dare origine a fraintendimenti e non è conforme a quanto previsto dalle linee guida internazionali (9-12).

Specifiche di qualità e definizione

4. Si definiscono metodi di laboratorio "ad alta sensibilità" ("high-sensitivity") per la misura delle troponine I e T i metodi immunometrici che sono in grado di misurare il 99° percentile della popolazione di riferimento con un CV ≤10%, come raccomandato da tutte le linee guida nazionali e internazionali (primo criterio: *conditio sine qua non*) (9-12).
5. I metodi "ad alta sensibilità" devono essere anche in grado di misurare i livelli circolanti delle troponine nella maggioranza dei soggetti adulti normali, sia in una popolazione di sole donne che in una di soli uomini (secondo criterio di classificazione) (10).
6. I metodi che misurano il 99° percentile della popolazione di riferimento con un CV ≤20% (ma >10%) si possono ancora utilizzare nella pratica clinica, ma non si devono definire ad alta sensibilità (9-12).
7. I metodi che invece misurano il 99° percentile con un CV ≥20% non devono più essere utilizzati per la diagnosi di IMA (6, 7, 9, 11).

BIBLIOGRAFIA

1. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined: a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2000;36:959-69.
2. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2007;50:2173-95.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2012;60:1581-98.
4. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. Clin Chem 2007;53:552-74.
5. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. Clin Chem 2007;53:547-51.
6. Thygesen K, Mair J, Katus H, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. Eur Heart J 2010;31:2197-204.
7. Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. Eur Heart J 2012;33:2252-7.
8. Casagranda I, Cavazza M, Clerico A, et al. Proposal for the use in emergency departments of cardiac troponins measured with the latest generation methods in patients with suspected ACS without persistent ST-segment elevation. Clin Chem Lab Med 2013;51:1727-37.
9. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the management of acute

coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2016;37:267-315.
10. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem 2018. doi:10.1373/clinchem.2017.277186.
11. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, et al. IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. Clin Chem 2017;63:73-81.
12. Apple FS, Collinson PO. IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. Clin Chem 2012;58:54-61.
13. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? Eur Heart J Acute Cardiovasc Care 2018. doi: 10.1177/2048872617748553.
14. Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? Clin Chem Lab Med 2009;47:1167-77.
15. Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. Clin Chem 2017;63:990-6.
16. Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. The 99th percentile of reference population for cTnI and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. Clin Chem Lab Med 2017;55:1634-51.
17. Apple FS, Collinson PO. IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. Clin Chem 2012;58:54-61.
18. Krintus M, Kozinski M, Boudry P, et al. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT highly sensitive troponin I immunoassay. Clin. Chem Lab Med 2014;52:1657-65.
19. Caselli C, Cangemi G, Masotti S, et al. Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a highly sensitive immunoassay method: Highly sensitive troponin I in pediatric age. Clin Chim Acta 2016;458:68-71.
20. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. Clin Chem Lab Med 2018. doi:10.1515/cclm-2017-0387.
21. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. Clin Chem Lab Med 2018. doi: 10.1515/cclm-2017-1101.
22. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. Clin Chem Lab Med 2018. doi: 10.1515/cclm-2017-0387.
23. Clerico A, Zaninotto M, Masotti S, et al. Valutazione delle performance analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio. Biochim Clin 2018;42:155-66.

I laboratori sono in grado di rispondere ai requisiti previsti dalla norma EN ISO 15189 per la Valutazione Esterna di Qualità? Studio esplorativo sui laboratori toscani per i più comuni misurandi di chimica clinica

Gianfranco Avveduto, Paola Pezzati, Massimo Quercioli
Centro di Riferimento Regionale Sod Sicurezza e Qualità AOU Careggi, Firenze

Caro Editore,

desideriamo proporre ai lettori di Biochimica Clinica alcuni spunti di riflessione sui requisiti previsti dalla norma EN ISO 15189:2012 "Medical laboratories-Requirements for quality and competence" (1), relativi alla partecipazione a programmi di VEQ come declinati da Accredia, l'ente unico nazionale di accreditamento designato dal governo italiano, con il Regolamento Tecnico (RT) 26 Prescrizioni per l'accreditamento con campo di accreditamento flessibile (2). La norma EN ISO 15189 specifica che, per la concessione o il mantenimento dell'accreditamento, i laboratori debbano presentare evidenza di aver conseguito risultati positivi durante la partecipazione agli esercizi VEQ. Il RT 26 richiede che il laboratorio, nel periodo precedente l'inoltro della richiesta di accreditamento, abbia ottenuto quattro risultati positivi consecutivi per ogni misurando di cui venga richiesto l'accreditamento in campo flessibile. Il documento RT 26 lascia tuttavia, di fatto, spazi per l'interpretazione sia al provider che al laboratorio.

Nell'ambito dei programmi VEQ, la prestazione del laboratorio è generalmente descritta statisticamente come scostamento dal valore target e valutata o come errore totale accettabile (ETA) predefinito oppure con altri indicatori statistici; ogni dato è quindi classificato come interno o esterno a limiti di accettabilità (LA) predefiniti. Come messo in evidenza dal vivace dibattito presente in letteratura (3-6), attualmente non esiste armonizzazione nell'ambito dei LA.

Nella nostra funzione di provider su mandato della Regione Toscana [Centro Regionale di Riferimento, Struttura Organizzativa Dipartimentale Sicurezza e Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi Firenze (CRRVEQ)], accreditato (PTP 0013) in base alla norma ISO 17043:2010 (7), vengono utilizzati, per la elaborazione dei risultati i seguenti parametri statistici: scostamento percentuale del valore inviato rispetto alla media di consenso del metodo (che, quando calcolato su più valori inviati rappresenta il bias %), rapporto tra la differenza del valore inviato rispetto alla media di consenso del metodo e deviazione standard dei risultati ottenuti con quel metodo (z). La prestazione del laboratorio è valutata in base allo scostamento del singolo risultato nei confronti del valore atteso. Tale scostamento rappresenta l'errore totale che viene valutato in base ai LA prestabiliti ed ogni risultato è quindi classificato come interno o esterno ad essi. I LA sono ridefiniti ad ogni inizio del ciclo annuale, pubblicati sul sito web del CRRVEQ (8) e rappresentano un compromesso tra il valore di ETA minimo/desiderabile/ottimale calcolato in base alla variabilità biologica (9) e il valore di ETA che deriva dalla revisione dei risultati pregressi dei partecipanti, assunto come stato dell'arte (settantesimo percentile della distribuzione degli ETA calcolati con tutti i risultati dei partecipanti). Tale scelta pragmatica, sebbene non sia l'unica possibile (3), è condivisa da vari provider a livello internazionale (10) ed ha lo scopo di indirizzare i partecipanti verso traguardi analitici raggiungibili, nello spirito della promozione del miglioramento della qualità. Tuttavia, alla funzione educativa della VEQ, si aggiunge, alla luce di RT 26, anche una funzione normativa, sulle cui ricadute ci siamo voluti interrogare.

Abbiamo condotto uno studio esplorativo sulla potenziale conformità alla norma EN ISO 15189, relativamente allo specifico ambito VEQ (RT 26-5.2.3), da parte dei laboratori toscani iscritti al programma Chimica Clinica, verificando i risultati nei primi quattro esercizi inviati per l'anno 2017. Il programma, continuativo, che prevede 12 esercizi di valutazione, fa parte degli schemi accreditati ISO 17043.

La ricognizione dei risultati dei 96 laboratori toscani partecipanti ai questi programmi di VEQ è stata condotta nel periodo gennaio 2017-maggio 2017, utilizzando i dati elaborati dall'applicativo gestionale (PRGVEQ) in dotazione al CRRVEQ. È stato selezionato per lo studio, un pannello di 20 misurandi (acido urico, aspartato transaminasi, bilirubina totale, calcio totale, cloruri, colesterolo totale, creatina chinasi, creatinina, ferro, fosfatasi alcalina, fosfati, glucosio, lattato deidrogenasi, magnesio totale, potassio, proteine totali, sodio, trigliceridi, urea, γ-glutamiltransferasi) monitorati per quattro esercizi VEQ consecutivi, per un totale di 7680 risultati. Sono stati conteggiati, per ogni

Corrispondenza a: Gianfranco Avveduto, Centro di Riferimento Regionale Sod Sicurezza e Qualità AOU Careggi, Via delle Oblate 1 Padiglione 69/a 50134 Firenze. E-mail avvedutog@aou-careggi.toscana.it

Ricevuto: 06.06.2018 Revisionato: 24.09.2018 Accettato: 25.09.2018

Pubblicato on-line: 31.10.2018 DOI: 10.19186/BC_2018.063

misurando selezionato, i risultati accettati (in quanto potenzialmente assimilabili ai risultati positivi) e non accettati (risultati negativi) di RT 26. Nei nostri programmi, i LA vengono corretti in base all'incertezza del valore assegnato come indicato dalla ISO 13528:2015 (11). In breve, l'incertezza (u_x) si reputa trascurabile se soddisfa la seguente relazione: u_x <0,3 DS (DS è lo scarto tipo dell'esercizio specifico per strumento e metodo/sistema). Qualora tale espressione non dovesse essere rispettata, il contributo di u_x viene considerato nell'elaborazione dei risultati, ampliando i LA. In altre parole, questo tipo di algoritmo permette di considerare, nella valutazione dello scarto percentuale tra risultato e valore assegnato, il contributo dovuto all'incertezza del valore assegnato stesso.

Nella nostra revisione di dati, abbiamo potuto osservare che 18 laboratori (18,8%) sarebbero risultati conformi al requisito della norma per tutti i 20 misurandi considerati, dal momento che tutti sono stati classificati all'interno dei LA in 4 esercizi consecutivi.

Se vengono valutati i singoli misurandi in maniera indipendente, la percentuale dei laboratori che risulta in accordo con la norma va dall'88,4% per la γ-glutamiltrasnsferasi al 53,1% per la creatinina (Tabella 1).

Tabella 1
Laboratori (in %) con risultati accettati rispetto ai LA per singolo analita su 4 esercizi consecutivi VEQ

Misurandi	LA (%)	% Laboratori con risultati accettati
Acido urico	10 per valori <3 mg/dL 9 per valori >3 mg/dl	78,9
Aspartato transaminasi	13 per valori <40 UI/L 10 per valori >40 UI/L	75,8
Bilirubina totale	30 per valori <0,3mg/dL 20 per valori compresi tra 0,3-0,5 mg/dL 12 per valori >0,5 mg/dL	72,0
Calcio totale	5 per valori <8 mg/dL 4,5 per valori compresi tra 8-13 mg/dL 5 per valori >13 mg/dL	60,9
Cloro	4,5 per valori <90 mmol/L 3,5 per valori >90 mmol/L	65,1
Colesterolo totale	8	85,9
Creatina chinasi	12	78,8
Creatinina	10 per valori <1 mg/dL 6,5 per valori >1 mg/dL	53,1
Ferro	20 per valori <30 μg/dL 10 per valori compresi tra 30-70 μg/dL 8 per valori >70 μg/dL	72,0
Fosfatasi alcalina	15	64,2
Fosforo	9 per valori <2,5 mg/dL 8 per valori >2,5 mg/dL	63,8
γ-glutamil transferasi	14	88,4
Glucosio	10 per valori <50 mg/dL 7 per valori 50-80 mg/dL 6 per valori >80 mg/dL	74,5
Lattato deidrogenasi	11	63,3
Magnesio totale	9 per valori <1,9 mg/dL 7 per valori compresi tra 1,9-4 mg/dL 9 per valori >4 mg/dL	62,3
Potassio	6 per valori <3 mmol/L 5 per valori>3 mmol/L	74,7
Proteine totali	6 per valori <50 g/L 4,5 per valori >50 g/L	63,0
Sodio	3	72,0
Trigliceridi	10	77,6
Urea	10	70,7

Abbiamo condotto un'ulteriore analisi sui laboratori che non avrebbero potuto ottemperare al requisito, per verificare quante misurazioni si erano dimostrate critiche e in quanti esercizi consecutivi. Il 6,3% dei laboratori avrebbe fallito il requisito a causa di un singolo risultato su 80 classificato come al di fuori dei LA; il 5,2% a causa di 2 su 80 risultati esterni ed il 3,1% a causa di 3 risultati esterni ai LA su 80.

Da quanto emerso, il RT 26, richiedendo che il laboratorio abbia partecipato con esito positivo agli ultimi quattro esercizi VEQ, prima della data di inoltro della domanda di accreditamento, può apparire come un obiettivo di non immediato raggiungimento, se non per un numero ristretto di laboratori. Inoltre, come prevedibile, la scelta e il numero dei misurandi da includere nella domanda di accreditamento rappresentano un aspetto critico.

Tuttavia sono necessarie alcune riflessioni relative alla definizione e applicazione dei LA da parte del provider e alla necessità di contestualizzare gli indicatori di performance. Il CRRVEQ, come sopra menzionato, utilizza LA che rappresentano un compromesso tra i valori di variabilità biologica, secondo le più recenti indicazioni EFLM, quando disponibili (12), (nelle tre accezioni di minimo, desiderabile, ottimale) e lo stato dell'arte delle misure (9).

Negli anni, il CRRVEQ, volendo mantenere l'aspetto formativo, ma consapevole che i programmi di VEQ hanno assunto sempre più un significato normativo/istituzionale, oltre a provvedere all'accreditamento dei propri programmi secondo la norma ISO 17043, ha teso ad ampliare i LA, senza che essi perdessero la loro significatività, perché mantenuti sempre all'interno dei traguardi dettati dalla variabilità biologica. D'altra parte, questi ultimi, in base alla Conferenza Strategica EFLM di Milano (13), collocandosi dopo "clinical outcome" e prima di "state of art" rappresentano criteri di valutazione di più alta scala gerarchica rispetto a quelli desunti dallo stato dell'arte.

Riteniamo che questa scelta rappresenti una posizione di equilibrio tra realtà operativa e necessario stimolo verso il miglioramento delle performances dei laboratori.

Quest'ultimo concetto riveste un grande valore nei percorsi di miglioramento di qualità ed è specificamente indicato nel mandato regionale del CRRVEQ della Regione Toscana.

Riteniamo che la nostra professione sia chiamata a confrontarsi e a dare un contributo in questo ambito specifico, stimolando la discussione tra le istituzioni e sostenendo sia il percorso di armonizzazione delle attività dei gestori di VEQ, che la funzione educativa degli esercizi di verifica esterna.

BIBLIOGRAFIA

1. https://www.iso.org/standard/56115.html (ultimo accesso: settembre 2018).
2. https://www.accredia.it/documento/rt-26-rev-05-prescrizioni-per-laccreditamento-con-campo-di-accreditamento-flessibile/ (ultimo: accesso settembre 2018).
3. Miller WG, Jones GRD, Horowitz GL, et al. Proficiency testing/external quality assessment: current challenges and future directions. Clinical Chemistry 2011;57:1670-80.
4. Jones GRD, Albarede S, Kessler D, et al. Analytical performance specifications for external quality assessment - definitions and descriptions. Clin Chem Lab Med 2017;55:949-55.
5. Carobene A, Franzini C, Ceriotti F. Comparison of the results from two different external quality assessment schemes supports the utility of robust quality specifications. Clin Chem Lab Med 2011;49:1143-9.
6. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statements from the first strategic conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med 2015;53:833-5.
7. https://www.iso.org/standard/29366.html (ultimo accesso: settembre 2018)
8. http://www.aou-careggi.toscana.it/crrveq/ (ultimo accesso: settembre 2018)
9. Borsotti M, Quercioli M, Franzini C. Criteri per la selezione dei limiti di accettabilità dei risultati nei programmi di Valutazione Esterna della Qualità. Biochim Clin 2008;32:260-68.
10. Haeckel R, Wosniok W, Kratochvila J, et al. A pragmatic proposal for permissible limits in external quality assessment schemes with a compromise between biological variation and the state of the art. Clin Chem Lab Med 2012;50:833-9.
11. https://www.iso.org/standard/56125.html (ultimo accesso: settembre 2018).
12. Carobene A, Braga F, Roraas T, et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ-glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med 2013;51:1997-2007.
13. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, et al. Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. Clin Chem Lab Med. 2017;55:1849-56.

155° Course, International School of Medical Sciences Ettore Majorana Foundation and Centre for Scientific Culture

Marcello Ciaccio
Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOUP "P. Giaccone", Palermo

Si è tenuto nei giorni 29-31 Maggio 2018 il 155° Corso dal titolo The New Era of Laboratory Medicine: from diagnosis to clinical management nell'ambito delle attività annuali della International School of Medical Sciences dell'Ettore Majorana Foundation and Centre for Scientific Culture (EMFCSC) di Erice, diretta dal professor Antonino Zichichi.

L'EMFCSC, fin dal 1962, anno della sua istituzione, richiama studiosi da tutto il mondo a presentare i risultati delle ricerche più all'avanguardia. Oggi la fondazione comprende più di 120 scuole che abbracciano quasi tutti i settori delle scienze di base ed applicate, dalla fisica, disciplina per cui la fondazione mantiene una forte vocazione, all'epidemiologia e medicina preventiva, farmacologia, neuroscienze, e molte altre.

Il corso è il primo nell'ambito delle attività dell'International School of Medical Sciences, diretta dallo stesso Zichichi e dal professor Ignazio Carreca, a trattare temi propri della Medicina di Laboratorio e di grande rilevanza per la Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica – Medicina di Laboratorio (SIBioC). I Direttori del corso, il professor Marcello Ciaccio ed il professor Francesco Salvatore, hanno ricoperto entrambi la carica di presidente SIBioC nei bienni, rispettivamente, 2016/2017 e 1985/1986 – 1987/1988 ed hanno contribuito con entusiasmo alla crescita della società.

Il filo conduttore del corso è stato la forte necessità di integrazione tra il dato biochimico-clinico e gli aspetti prettamente clinici, elemento essenziale della Medicina di Laboratorio di oggi. Al corso hanno partecipato illustri relatori, molti dei quali soci SIBioC e figure di riferimento nel panorama della Medicina di Laboratorio, che si sono alternati tra le sessioni scientifiche portando il proprio contributo e le loro conoscenze nell'ottica di fornire un momento di confronto e di crescita culturale per i discenti. I partecipanti al corso, professionisti di diversa nazionalità, hanno avuto l'occasione di trascorrere con i docenti tutti i momenti di apprendimento e di confronto presso le strutture dell'EMFCSC, nel pieno rispetto dello spirito di condivisione tra docenti e discenti che caratterizza tutte le attività della fondazione e che rende unici questi corsi rispetto alle comuni attività congressuali a cui siamo abituati a partecipare.

Un momento di vibrante interesse scientifico è stata la *Lectio Magistralis* tenuta dal professor Carlo Croce, eminente scienziato di fama internazionale proveniente dalla prestigiosa Università dell'Ohio (USA), dal quale è stato possibile apprendere come i "non-coding" RNA siano coinvolti nella patogenesi del cancro.

Nella prima sessione, dopo un aggiornamento sull'uso della misura delle troponine cardiache ad alta sensibilità, è stato affrontato il tema del ruolo dei biomarcatori cardiaci nell'esercizio fisico o in contesti clinici in cui il coinvolgimento cardiovascolare è meno caratterizzato, come nella valutazione della cardiotossicità da agenti antineoplastici o degli outcomes cardiovascolari dei pazienti con epatite C.

Ampio spazio è stato dato durante il corso alle tecnologie emergenti per lo studio di biomarcatori tumorali e sul loro impiego clinico. In particolare, nella seconda sessione sono state delineate le più recenti acquisizioni sul DNA tumorale libero circolante con specifiche applicazioni nel "non small cells lung cancer" e nei tumori della mammella e dell'ovaio, la farmacogenetica nell'era della medicina personalizzata in campo oncologico e l'uso appropriato dei biomarcatori tumorali di natura proteica.

Un tema caro ai direttori del corso è sempre stato quello delle scienze "omiche" e della medicina personalizzata, a cui è stata dedicata un'intera sessione, trattando le specifiche applicazioni della genomica nella conoscenza del microbioma, della proteomica nella diagnostica dell'amiloidosi sistemica, della metabolomica nei disordini congeniti del metabolismo.

Durante la sessione dedicata alla diagnostica molecolare, che ha visto la partecipazione di eminenti genetisti, si è parlato della diagnostica prenatale mediante lo screening prenatale non invasivo basato sul DNA, che rappresenta una tematica di grande attualità nel campo della Medicina di Laboratorio, così come la diagnosi genetica delle malattie orfane o il contributo dei modelli *ex-vivo* nello studio della diagnosi e terapia personalizzata della fibrosi cistica.

Infine, nell'ultima sessione, dedicata alle neuroscienze, è stato delineato il contributo importante che, oggi, la Medicina di Laboratorio apporta all'inquadramento diagnostico della malattia di Alzheimer e di altre tau-patie secondarie mediante i biomarcatori liquorali e le tecniche di imaging.

Il corso ha goduto del patrocinio di società scientifiche nazionali e internazionali tra cui l'IFCC, la EFLM, la SIBioC, l'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), la Society for Cerebro Spinal Fluid Analysis and Clinical Neurochemistry, nonché di istituzioni quali l'Università degli Studi di Palermo e il Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche (DIBiMed), il Ceinge – Biotecnologie avanzate di Napoli, la Regione Sicilia e l'Assessorato Regionale dell'Istruzione e della Formazione Professionale.

Marcello Ciaccio

Ringraziamento

Il Direttore e l'Editore della rivista ringraziano i componenti del Comitato Editoriale e i seguenti colleghi per la collaborazione nella revisione dei manoscritti inviati a Biochimica Clinica nel corso del 2018.

Acknowledgement

The Editor-in-Chief and the Publisher would like to thank the members of the Editorial Board and the following colleagues for their kind assitance in reviewing articles submitted to Biochimica Clinica in 2018.

Carlo Artusi, Padova
Gaetano Bernardi, Milano
Marco Besozzi, Milano
Tiziana Biagioli, Firenze
Paolo Bucchioni, Sarzana (SP)
Sabrina Buoro, Bergamo
Anna Carobene, Milano
Floriana Carobene, Napoli
Paolo Carraro, Venezia
Mariarosa Carta, Vicenza
Ferruccio Ceriotti, Milano
Antonio D'Avolio, Torino
Giorgio Da Rin, Bassano del Grappa (VI)
Federica De Liso, Milano
Antonio Fortunato, Ascoli Piceno
Davide Giavarina, Vicenza
Giuseppe Lippi, Verona
Bruna Lo Sasso, Palermo
Fulvio Magni, Monza (MB)
Alessandra Marini, Lido di Camaiore (LU)
Martina Montagnana, Verona
Benedetto Morelli, Castenedolo (BS)
Andrea Mosca, Milano
Antonello Nonnato, Torino
Cosimo Ottomano, Monza
Renata Paleari, Milano
Silvia Persichilli, Roma
Paola Pezzati, Firenze
Elisa Piva, Padova
Roberto Riva, Bologna
Manuela Seia, Milano
Alessandro Terreni, Firenze
Rossella Tomaiuolo, Napoli
Matteo Vidali, Novara
Carlo Zambon, Padova
Martina Zaninotto, Padova

Volume 42, 2018
Indice dei contenuti
Index of contents

EDITORIALI - EDITORIALS

Saluto del Direttore 14

Comunicare i risultati critici: raccomandazioni e stato-dell'arte 93

Procalcitonina: una palestra metodologica 95

Il Syllabus di EFLM per la formazione post-laurea dei professionisti Europei: una preziosa opportunità per la definizione a livello europeo dello Specialista in Medicina di Laboratorio 189

Il documento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sulla diagnostica in vitro: una riflessione critica è necessaria 281

Appropriatezza degli esami di screening oncologici: il caso dell'antigene prostatico specifico 283

RASSEGNE - REVIEWS

La variabilità biologica: le basi teoriche e l'esperienza dei Gruppi di Lavoro della Federazione Europea di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio 15

Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1 97

Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino 103

La diagnosi di malaria: ruolo dell'esame emocromocitometrico nello screening 191

Shaping the epigenetic basis of Werner Syndrome 210

Il ruolo di tecniche di sequenziamento genico ad elevata produttività per la diagnosi molecolare dei tumori ereditari della mammella 285

CONTRIBUTI SCIENTIFICI - SCIENTIFIC PAPERS

^{1}H NMR-based metabolomics study on follicular fluid from patients with Polycystic Ovary Syndrome 26

Valutazione del sistema OptiliteTM per la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero 32

L'uso dei biomarcatori del liquido cerebrospinale nella diagnosi della malattia di Alzheimer: un'indagine tra i laboratori italiani 39

Cinnamaldehyde and cinnamic acid from cinnamon bark (Cinnamomum verum) increase the binding of glucose to human albumin 112

INDICE

Indagine conoscitiva congiunta SIBioC-Medicina di Laboratorio e Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO) relativa alla gestione del processo diagnostico del liquido pleurico 119

La check list in medicina di laboratorio quale strumento di assicurazione della qualità e sicurezza del paziente: l'esempio del prelievo venoso 131

La gestione del rischio clinico in medicina di laboratorio: risultati del questionario congiunto SIBioC-Medicina di Laboratorio e Società Italiana di Ergonomia (SIE) inviato ai laboratori della Regione Toscana 141

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 217

L'ormone anti-Mülleriano come marcatore di scarsa risposta alla stimolazione ovarica 225

Glycated albumin is correlated to insulin resistance and β-cell secretory function in subjects at risk of developing diabetes 234

Valutazione dei valori di emoglobina glicata in presenza di anemia sideropenica: risultati di uno studio retrospettivo osservazionale 240

Sicurezza del paziente e rischio clinico nel processo ematologico di laboratorio 294

Un nuovo ruolo del CYP2R1 nella sclerosi multipla 307

Disposizioni normative in Italia per la gestione dei Point of Care Testing: un'indagine SIBioC nelle regioni italiane 313

OPINIONI - OPINIONS

Indagini genetiche di nuova generazione e terapia personalizzata: l'esempio vincente della Fibrosi Cistica 44

La procalcitonina in terapia intensiva: dubbi che rimangono? 146

L'analisi dello stato di instabilità dei microsatelliti per la diagnosi e la terapia dei tumori correlati alla sindrome di Lynch 152

Diagnostica di laboratorio del rischio nefrolitiasico 318

Qualità delle raccomandazioni o raccomandazioni di qualità? Il caso dell'antigene prostatico specifico nello screening del carcinoma della prostata 326

Antigene prostatico specifico, screening del cancro della prostata, linee guida e il giudice saggio 329

DOCUMENTI

Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimental 51

Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio. Documento congiunto del 155

Gruppo di Studio Biomarcatori Cardiovascolari di SIBioC-Medicina di Laboratorio ed European Ligand Assay Society (ELAS)

Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in medicina di laboratorio: versione n 5 (2018) 247

Medicina di laboratorio e Medicina d'urgenza: un connubio indissolubile 335

DOCUMENTI SIBioC - SIBioC DOCUMENTS

Documento di consenso SIBioC-Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) sull'utilizzo in Pronto Soccorso dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi batterica 62

Determinazione delle immunoglobuline E specifiche 74

Raccomandazioni per l'identificazione e la gestione dei risultati critici nei laboratori clinici 167

Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico 263

Efficacia e utilità del monitoraggio terapeutico di autoanticorpi e farmaci inibitori del Tumor Necrosis Factor alpha in pazienti in trattamento per patologie autoimmuni 266

Specifiche di qualità, terminologia e definizione dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T 343

LETTERE ALL'EDITORE - LETTERS TO THE EDITOR

Determinazione della concentrazione dell'inibitore C1 esterasi nel siero: un invito alla standardizzazione 79

Procalcitonina in terapia intensiva: più certezze che dubbi 180

I laboratori sono in grado di rispondere ai requisiti previsti dalla norma EN ISO 15189 per la Valutazione Esterna di Qualità? Studio esplorativo sui laboratori toscani per i più comuni misurandi di chimica clinica 347

NOTIZIE SIBioC - SIBioC NEWS

In ricordo di Giovanni Ceriotti 82

155° Course, International School of Medical Sciences Ettore Majorana Foundation and Centre for Scientific Culture 350

RECENSIONI - BOOK REVIEW

Quando ti porti il lavoro a casa: leggendo "Tossicologia! Perché ciò che non conosci ti può uccidere" di Alan Wu 274

INDICE

CASI CLINICI - CASE REPORTS

Mieloma multiplo IgD lambda: "switch" isotipico immunoglobulinico dopo trapianto autologo e1

Interferenze da farmaci biologici: un caso di accumulo di Bevacizumab e5

Una diagnosi in laboratorio e8

Un caso insolito di mieloma a catene leggere e12

La misura delle catene leggere libere indentifica la ricaduta di malattia e orienta per una rivalutazione della tipizzazione dell'amiloide in una paziente con amiloidosi AL e15

Un caso di anemia multifattoriale e18

La misura delle catene leggere libere nel liquor nella diagnosi della sclerosi multipla e22

Un liquor particolarmente informativo e26

Una proteinuria sottovalutata e29

La misura delle catene leggere libere e i recenti criteri diagnostici del mieloma multiplo e33

Ruolo del laboratorio nella valutazione di un donatore di organi con sospetta emofilia A e37

Utilità della determinazione della frazione delle piastrine immature nella diagnostica delle trombocitopenie autoimmuni e40

L'utilità della revisione microscopica nella diagnostica della malaria: un'infezione sub-microscopica da Plasmodium falciparum e43

Tre neonati con sindrome di Down ed alterazioni ematologiche e47

Sinergia tra esperienza dell'operatore e analizzatori del sedimento urinario nella diagnosi di infezione da Poliomavirus BK e50

Il contributo della misura delle catene leggere libere plasmatiche alla diagnostica della malattia da deposito delle catene leggere e53

Individuazione e identificazione di una nuova variante emoglobinica durante la quantificazione dell'emoglobina glicata e56

Volume 42, 2018
Indice degli autori
Index of authors

Abou-Khalil R.	112	Bernardini S.	39, 234
Agnello L.	234,307	Berni Canani R.	103
Aita A.	131,141,294	Bertona M.	240
Albertini R.	e15	Bitar J.	112
Altavilla P.	234	Bivona G.	234, 307
Alviggi C.	26	Bonaguri C.	266
Amato J.	26	Bondanini F.	210
Angilletta R.	e43	Bonetti G.	167, 263
Apuzzo A.	318	Bonfant G.	e50
Artusi C.	51	Bonfanti L.	335
Avveduto G.	347	Boria A.M D.	225
Azzini A.M	146	Borille S.	32
Bacalini M.G.	210	Bosoni T.	e15
Balboni F.	62,141,167,294,335	Bou-Absy R.	112
Banfi G.	167	Brambilla P.	240
Barberio G.	e56	Brancaccio D.	26
Basile U.	266	Brusca I.	74
Basset M.	e15	Buccino G.	318
Bassi A.	294	Buoro S.	119, 191, 294, e40, e47
Baum H.	247	Buzzi R.	e33
Bazzan M.	e12	Caltagirone C.	39
Belfanti P.	e50	Calzoni P.	e37
Bellia C.	234,307	Campisi M.P.	e56
Bellini C.	e37	Canessa P.A.	119
Bellomo G.	e56	Cangemi G.	51
Bellone A.	62	Cangiano G.	318
Bernardi B.	e50	Cantù M.	51
Bernardi G.	39, 119, e26	Cappellini F.	240

Capuano M.	318	Crespi I.	e56
Caracciolo E.	e1	Curci P.	e53
Carobene A.	15	D'Amora M.	318
Carraro P.	335	D'Argenio V.	103, 285
Carrozza R.	e33	D'Avolio A.	51
Carta M.	263	D'Oriano L.	26
Caruso B.	74	D'Urso A.	217
Casagranda I.	62	Da Rin G.	62, 191, 294, 335
Caserta M.A.	e43	Dabrowska M.	247
Casprini P.	141	Danese E.	97
Catalano L.	e1	Daves M.	167
Cavallo M.R.	e43	De Francesco S.	e53
Cavazza M.	62, 335	de Grazia U.	217
Ceriotti F.	85, 247, 281	de Liso F.	e5
Cerutti L.	e40	De Michele T.	e22
Cervellin G.	62, 335	De Palma F.D.E.	103
Charilaou C.	247	De Riva V.	217
Chiasserini D.	39	De Santis E.	266, e5
Chifiriuc M.C.	247	De Sisto E.	e1
Ciaccio M.	62, 119, 234, 307, 350	Del Mese G.	e26
Ciardelli M.L.	294	Dell'Abate M.T.	e22
Cibinel G.A.	e43	Demarinis L.	e53
Cicilano M.	e12	Dente B.	74
Cigliana G.	e5	Di Benedetto M.	e50
Cinci F.	e37	Di Maggio F.	285
Cinti B.	74	Di Maina E.	318
Ciulla E.	225	Di Perna M.	e1
Clerico A.	155, 343	Di Santo S.	39
Coen D.	62, 335	di Serio F.	e53
Condò C.	e43	Dima F.	191
Contarato G.	217	Dolci A.	167
Conti L.	e5	Dominoni P.	e40, e47
Corsini E.	e26	Dorizzi R.M.	146
Cosma C.	234	Doumit S.	112

Duranti D. e56
Duraturo F. 152
Errico A. 318
Esposito M.V. 285
Faggian D. 74
Fanelli A. 191, 294
Fantini N.N. e5
Farci Santarcangeli D. 167
Fineschi D. e37
Fiorini M. 141
Foli A. e15
Fontana F. 217, e26
Fortunato A. 343
Franceschi C. 210
Franceschini E. e37
Francione S. 191, 294
Fringuelli L. e33
Fuzzi G. 141
Gabrieletto I. 217
Galloni E. 217
Gasparini S. 119
Gervasoni J. 51
Gesualdo L. e53
Giavarina D. 62, 167, 283
Gibellini M. 39
Gilardoni F. 217
Gioia M. 294
Gion M. 329
Giostra F. 62
Giustiniano M. 26
Granero V. 191, e43
Graziani M.S. 14, 95, 189, 281, 343
Guastafierro T. 210
Gubbiotti A. e29
Guerranti R. 141, 294
Guerranti R.G e37
Guzzetti S. 62
Homšak E. 247
Iaccarino N. 26
Illuminati G. e5
Improta P. 318
Infusino I. 32, 74
Intra J. 240
Ippoliti G. e37
Ivaldi G. e56
Izzo P. 152
Jassam N. 247
Khoury E. 112
Kovac G. 247
Lake J. 247
Lamanna A. 318
Lapolla A. 263
Latte A. 318
Lavatelli F. e15
Leoncini R. e37
Lerza R. 335
Levi S.L. 225
Li Bergolis F. e15
Lichtinghagen R. 247
Lima-Oliveira G. 167
Limonta G. 240
Lippi G. 62, 97, 119, 167, 180, 335
Lo Sasso B. 234, 266, 307
Locatelli M. 167
Lopergolo D. e22
Lucarelli M. 44
Madia C. 335
Maffei M. e56

Maiavacca R. e5
Malgrande A. e29
Manenti B. e40, e47
Manes M. e50
Manno C. e53
Marchiando M. e56
Marcoccia A. 210
Marin R. 131
Marinova M. 51
Masotti S. 155, 343
Mastrangelo M. e26
Matinato C. e5
Mattiuzzi C. 180
Mazzarello M.G. 74
Melegari A. 266
Merlini G. e15
Merlino F. 26
Miccoli R. 263
Miconi V. 167
Migliardi M. 343
Miglio L. e56
Milani P. e15
Milano S. 307
Milletti E. e37
Mion M. 155, 343
Mogni M. e56
Molino A. e50
Montagnana M. 62, 97, 167, 335
Montanaro M. e33
Montinaro V. e53
Morandini M. 167
Mosca A. 189, 263
Muratore M.T. e33
Musetti V. 155
Nannini P. e26
Nasser R. 112
Nocerino R. 103
Nonnato A. 51
Novellino E. 26
Nunziato M. 285
Nuvolone M. e15
Nuzzi F. 318
O'Mullane J. 247
Ohlson M. 247
Ortolani C. 191
Ottolenghi A. 225
Pacifici R. 274
Pagano B. 26
Pagliaro M. e12
Palladini G. e15
Panteghini M. 32, 74
Paolillo C. 335
Paparo L. 103
Parnetti L. 39
Passino C. 155
Patrucco G. 313
Pauri P. 62
Pecoraro V. 266
Pelliccia S. 26
Persichilli S. 51
Pescatori T. 225
Peyronel E. e43
Pezzati P. 95, 119, 141, 167, 294, 347
Piccolo F. e1
Piccone G. e29
Pipitone S. 191
Pirolini L. e15
Piva E. 131

Piva E. 167, e18
Pizzolanti G. 234
Pizzuti L. e5
Plebani M 83, 93, 131, 155, 234 326, 343, e18
Polito C. 318
Pozzato C. 131
Prontera C. 155, 343
Queralto J. 247
Quercioli M. 141, 167, 294, 347
Racek J. 247
Ragonese P. 307
Raimondo D. 210
Rako I. 247
Rampoldi E. 313
Randazzo A. 26
Ranzato F. 217
Ripoli A. 155
Rizos D. 247
Rolla R. 191
Ronchi M. e5
Rosengart L. e29
Rossano R. 318
Rossini M. e53
Russo F. e15
Salemi G. 307
Saliva E. e56
Salvagno G.L. 167
Salvatore F. 82, 103
Sancesario G. 39, 335
Sarappa A. 318
Savoia M. e1
Sbrojavacca R. 62
Scacchetti T. 74
Scapellato C. 141, 294, e37
Scazzone C. 307
Schiavinato A. e18
Sciacovelli L. 131
Scribano D. e22
Seghezzi M. 119, e40, e47
Serino R. e56
Sette P. 146
Silvietti A. e37
Simoncini M. e12
Spanò A. 210
Starnone F. 285
Szöke D. 74
Tartaglia R. 141, 167
Terzuoli L. e37
Testa R. 263
Timpanaro C. 74
Toccafondi G. 141, 167
Tomei A. 141
Tomei A.T 294
Toniolo S. 39
Tosato F. 294, e18
Trapè G. e33
Trenti T. 62, 266
Troiano T. e53
Tufano A. 318
Urbani A. e22
Vaccarino A. e12
Vannoni D. e37
Vernocchi A. e5
Verschuure P. 247
Vitkus D. 247
Wieringa G. 247

Zacheo I.	e1
Zaninotto M.	155, 234, 343
Zardo L.	335
Zuccotti G.V.	e26
Zuin G.	e26
Zuppi C.	e22