
BC

biochimica clinica

In questo numero:

LA VARIABILITÀ BIOLOGICA

vedi pag. 15

RACCOMANDAZIONI SIBioC

Marcatori di sepsi batterica in Pronto Soccorso

Determinazione delle IgE specifiche

vedi pagg. 62, 74



SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di

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



 **BIOMEDIA**
La condivisione del sapere

sommario



| | | |
|------------------------|-----------|---|
| EDITORIALE | 14 | Saluto del Direttore <i>M.S. Graziani</i> |
| RASSEGNE | 15 | La variabilità biologica: le basi teoriche e l'esperienza dei Gruppi di Lavoro della Federazione Europea di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio <i>A. Carobene</i> |
| CONTRIBUTI SCIENTIFICI | 26 | ¹ H NMR-based metabolomics study on follicular fluid from patients with Polycystic Ovary Syndrome <i>N. Iaccarino, J. Amato, B. Pagano, A. Pagano, L. D'Oriano, S. Pelliccia, M. Giustiniano, D. Brancaccio, F. Merlino, E. Novellino, C. Alviggi, A. Randazzo</i> |
| | 32 | Valutazione del sistema Optilite™ per la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero <i>I. Infusino, S. Borille, M. Panteghini</i> |
| | 39 | L'uso dei biomarcatori del liquido cerebrospinale nella diagnosi della malattia di Alzheimer: un'indagine tra i laboratori italiani <i>G. Sancesario, M. Gibellini, S. Toniolo, S. Di Santo, D. Chiasserini, G. Bernardi per il Gruppo di Studio SIBioC "Liquidi Cavitari", M. Musicco per la Piattaforma Italiana per le Malattie Neurodegenerative (ITALPLANED) della Società Italiana di Neurologia per le Demenze (SINdem), L. Parnetti, C. Caltagirone, S. Bernardini</i> |
| OPINIONI | 44 | Indagini genetiche di nuova generazione e terapia personalizzata: l'esempio vincente della Fibrosi Cistica <i>M. Lucarelli</i> |
| DOCUMENTI | 51 | Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali <i>A. D'Avolio, M. Cantù, J. Gervasoni, C. Artusi, M. Marinova, A. Nonnato, G. Cangemi, S. Persichilli per il Gruppo di Studio SIBioC "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche"</i> |
| DOCUMENTI SIBioC | 62 | 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 <i>G. Lippi, M. Montagnana, F. Balboni, A. Bellone, I. Casagrande, M. Cavazza, G. Da Rin, D. Coen, D. Giavarina, F. Giostra, S. Guzzetti, P. Pauri, R. Sbrojavacca, T. Trenti, M. Ciaccio, G. Cervellin</i> |
| | 74 | Determinazione delle immunoglobuline E specifiche <i>D. Faggian, I. Brusca, B. Cinti, B. Caruso, B. Dente, M.G. Mazzarello, T. Scacchetti per il Gruppo di Studio SIBioC "Allergologia di Laboratorio"</i> |
| LETTERE ALL'EDITORE | 79 | Determinazione della concentrazione dell'inibitore C1 esterasi nel siero: un invito alla standardizzazione <i>I. Infusino, C. Timpanaro, D. Szöke, M. Panteghini</i> |

sommario

NOTIZIE SIBioC

82

In ricordo di Giovanni Ceriotti
F. Salvatore

83

Il ricordo di un Maestro del laboratorio clinico: Giovanni Ceriotti
Mario Plebani

85

Breve curriculum del Prof. Giovanni Ceriotti
F. Ceriotti

CASI CLINICI

e1

Mieloma multiplo IgD lambda: "switch" isotipico immunoglobulinico dopo trapianto autologo
F. Piccolo, E. Caracciolo, E. De Sisto, M. Di Perna, I. Zacheo, L. Catalano, M. Savoia

e5

Interferenze da farmaci biologici: un caso di accumulo di Bevacizumab
E. De Santis, G. Illuminati, L. Pizzuti, A. Vernocchi, L. Conti, G. Cigliana

e8

Una diagnosi in laboratorio
F. de Liso, M. Ronchi, C. Matinato, N.N. Fantini, R. Maiavacca

e12

Un caso insolito di mieloma a catene leggere
M. Simoncini, A. Vaccarino, M. Pagliaro, M. Cicilano, M. Bazzan

save the date



50° Congresso Nazionale

SIBioC-Medicina di Laboratorio
Società Italiana di Biochimica Clinica
e Biologia Molecolare Clinica

Innovazione
nella Medicina di Laboratorio

NAPOLI, 16-18 Ottobre 2018
Città della Scienza

www.congresso.sibioc.it

un evento
organizzato da



BIOMEDIA
La condivisione del sapere



biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

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

membro di

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

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

Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

Reviews Editor

Martina Zaninotto

Associate Editors

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

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

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

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

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

SIBioC Executive Board

2018-2019

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

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

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

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

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

Associato all'USPI

Unione Stampa

Periodica Italiana

Tiratura di questo

numero 4000 copie

4000 copies of this

issue have been printed

ISSN 0393-0564

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



Volume 42

Numero 1 - Marzo 2018

biochimica clinica

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

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

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

Le norme che seguono devono essere obbligatoriamente osservate, pena la non accettazione degli elaborati.

Per elaborati destinati a sezioni diverse dai Contributi Scientifici non è tuttavia necessaria la suddivisione nei capitoli sotto menzionati. Gli elaborati inviati come Lettere all'Editore dovranno contenere al massimo 1200 parole, includere una sola tabella o figura e non più di 12 riferimenti bibliografici. Per questo tipo di contributi non è richiesto l'Abstract, mentre è richiesto il titolo in Inglese.

PREPARAZIONE DEL MANOSCRITTO

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

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

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

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

Non è richiesto il Riassunto in italiano.

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

Materiali e metodi: descrivere in maniera esaustiva casistiche cliniche o di popolazione; reagenti chimici e biologici; kit diagnostici, calibratori, materiali di controllo; strumenti e sistemi analitici; metodi analitici; metodi statistici. Nel caso di utilizzo di reagenti e sistemi analitici commerciali di uso corrente è sufficiente indicare il principio del metodo e il sistema analitico commerciale impiegato. Nell'uso dei metodi statistici attenersi alle indicazioni riportate alla fine di queste Norme.

Nel caso di utilizzo di casistiche cliniche e/o campioni biologici provenienti da soggetti umani è obbligatoriamente richiesta una dichiarazione (da inserire nel testo) che durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 (http://www.wma.net/e/humanrights/policy_meetings.htm) e, nel caso di utilizzo di campioni biologici appositamente raccolti, si è ottenuto un specifico Consenso Informato da ciascuno dei soggetti arruolati nello studio.

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

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

Figure: devono essere in bianco e nero, di qualità grafica tale da consentirne la diretta riproduzione, tenendo conto

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

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

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

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

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

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

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

1. Soper CPR, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic insulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:497-501.
2. Barrati J, Ettalbi M. Thermostable insulinases from *A. ficcum*. In: Fusch A, ed. *Insulin and insulin-containing crops*. London: Elsevier Science Publisher, 1993:211-6.
3. Constantin E, Schnell A, eds. *Mass spectrometry*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1991.

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

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

CASI CLINICI

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

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

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

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

Bibliografia: fino a un massimo di 10 voci bibliografiche.

Tabelle/Figure: non più di 2 in totale.

In ragione dell'utilizzo dei Casi Clinici per gli eventi formativi a distanza (FAD) SIBioC, verranno presi in considerazione

solo contributi in italiano; è necessario inoltre allegare al manoscritto un articolo di approfondimento sull'argomento (ad es., una rassegna), che sia liberamente scaricabile e possibilmente in italiano, e 6 domande a risposta multipla (4 opzioni), 3 relative al Caso Clinico e 3 relative all'articolo di approfondimento, da inserire nel questionario ECM.

INVIO ELETTRONICO DEL MANOSCRITTO

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

Avvertenza importante: Conservare copia di tutti i file inviati.

IMPAGINAZIONE

Testo e tabelle

Pagina 1. Riportare: a) Titolo; b) Autori nell'ordine prescelto, nome seguito dal cognome, ciascuno con il primo nome proprio per esteso; c) Affiliazione(i), con un numero progressivo in apice come riferimento al(agli) Autore(i), se presente più di un'affiliazione; d) Nome e indirizzo completo (incluso telefono, fax, e-mail) dell'Autore a cui inviare la corrispondenza. Pagina 2. Abstract in lingua inglese.

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

Figure

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

LETTERA DI ACCOMPAGNAMENTO

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

REVISIONE ED ACCETTAZIONE

L'Editore di BC si riserva di accettare o meno i lavori inviati dopo consultazione di revisori esterni altamente qualificati. Modifiche di stile o di linguaggio nel testo o nell'iconografia possono essere introdotte direttamente dalla Redazione e approvate dagli Autori in sede di correzione delle bozze.

ESTRATTI

Una volta pubblicato il lavoro, l'Autore corrispondente ne riceverà il file elettronico in .pdf, con l'implicito accordo che sarà sua responsabilità farne avere copia a eventuali coautori.

Di norma non sono inviati estratti cartacei dei lavori pubblicati. A pagamento possono tuttavia essere prodotti estratti da fornire su richiesta.

INDIRIZZO A CUI INVIARE GLI ELABORATI

e-mail: biochimica.clinica@sibioc.it

Redazione di Biochimica Clinica

Telefono 0245498282 int. 216; fax 0245498199

ABBREVIAZIONI

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

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

LINEE GUIDA PER LA VALUTAZIONE STATISTICA

Queste linee guida hanno lo scopo di aiutare gli Autori a preparare i dati statistici per la pubblicazione e non sono un sostituto delle istruzioni dettagliate necessarie per la progettazione di uno studio o per eseguire una analisi statistica. Ogni sezione di un articolo scientifico viene trattata separatamente.

Riassunto: il numero e la fonte dei dati devono essere indicati e le conclusioni che hanno una base statistica devono essere documentate includendo le statistiche descrittive pertinenti [media o mediana, deviazione standard (DS) o intervallo interquartile, coefficiente di variazione percentuale (CV%), limiti di confidenza al 95%, equazioni di regressione, ecc.].

Metodi: disegno sperimentale, selezione dei soggetti e procedure di randomizzazione devono essere descritte e l'accuratezza analitica deve essere riportata laddove pertinente. L'ipotesi da verificare mediante una procedura statistica deve essere indicata e, laddove appropriato, i calcoli della potenza per la dimensione del campione utilizzata dovrebbe essere forniti (si raccomanda che la potenza sia >80%). In studi caso-controllo, definire con chiarezza come casi e controlli sono stati selezionati e quale corrispondenza ha avuto luogo.

I test statistici devono essere descritti, ma non è necessario riportarne i riferimenti a meno che non siano inusuali o siano applicati in modo non-standard. Il "software" per computer utilizzato dovrebbe essere riportato.

Se il lavoro riporta i risultati di uno studio diagnostico leggere la dichiarazione STARD (1) e per una sperimentazione clinica leggere il documento CONSORT (2) al fine di migliorare la qualità del lavoro.

Risultati: cifre arrotondate sono più facili da confrontare e decimali extra raramente sono importanti. Le statistiche descrittive richiedono una cifra aggiuntiva rispetto a quelle utilizzate per i dati grezzi. Le percentuali non devono essere espresse con più di un decimale e non devono essere utilizzate con piccoli campioni.

Dati distribuiti normalmente devono essere descritti utilizzando media, DS e/o CV% ed espressi come »media (DS)« e non come »media±DS«. Quando i dati non sono distribuiti normalmente, dopo averne dato la dimostrazione con un test [ad es. test di Shapiro-Wilk (3)], utilizzare la mediana e l'intervallo interquartile al posto di media e DS. Una distribuzione asimmetrica può spesso essere normalizzata mediante una trasformazione logaritmica o una trasformazione di potenza. L'analisi statistica e il calcolo delle statistiche di sintesi devono essere effettuati sui dati trasformati, mentre nelle statistiche riassuntive i dati dovrebbero essere trasformati di nuovo nella scala originale per la presentazione. Se viene utilizzata una scala logaritmica, i grafici dovrebbero riportare i dati non-trasformati su una scala logaritmica.

Grafici che mostrano dati di grandezza comparabile dovrebbe essere di dimensioni e stile simili. Tutti i punti individuali devono essere visualizzati se possibile spostando i punti di sovrapposizione. Barre di errore che indica l'errore standard della media (SE) o l'intervallo interquartile, a seconda dei casi, possono essere utilizzate per aiutare l'interpretazione dei dati.

I risultati dei test di significatività come il test t di Student e il test chi-quadro devono essere presentati con le statistiche descrittive, i gradi di libertà (se del caso) e la probabilità P. La validità delle ipotesi dovrebbe essere controllata (ad

esempio i test-t convenzionali assumono una distribuzione normale e varianza uguale per ogni set di dati). Per l'analisi di tabelle di contingenza 2×2 con il test chi-quadro deve essere applicata la correzione per la continuità, e per piccole frequenze attese deve essere utilizzato test esatto di Fisher.

I valori di P dovrebbero essere riportati per esteso in 1 o 2 cifre significative. Evitare di descrivere i valori di P come $>0,05$ o NS (non significativo). Se i risultati sono molto significativi e il valore di P calcolato è ad esempio 0.000, allora l'uso di $P < 0,0005$ è accettabile. Gli intervalli di confidenza vanno precisati, in particolare per i risultati non significativi. Il livello di significatività statistica utilizzato convenzionalmente è $P \leq 0,05$. Se viene utilizzato un livello di significatività diverso, le ragioni di questa scelta devono essere chiaramente indicate nella sezione dei metodi statistici.

Discussione: la significatività statistica non dovrebbe essere equiparata all'importanza clinica e valori di P non devono essere confrontati tra diversi test statistici. L'associazione non deve essere interpretata come causale, senza ulteriori prove ed evidenze.

Aree problematiche: i confronti multipli possono produrre valori di significatività errati e fuorvianti. L'ipotesi principale deve essere sempre chiaramente indicata e le associazioni rilevate tramite analisi retrospettiva devono essere interpretate con cautela. Quando è possibile un solo test statistico generale dovrebbe essere applicato, come ad esempio l'ANOVA. Se questo non è significativo, i confronti multipli non devono essere applicati. Se è significativo può essere applicata una qualche forma di test a intervallo multiplo. Se non è possibile applicare un singolo test generale i confronti multipli devono utilizzare un livello di significatività di tipo Bonferroni.

Con i dati appaiati le differenze tra le singole coppie di dati e la variabilità delle differenze sono più importanti dei singoli valori. Anche la rappresentazione grafica dovrebbe mostrare la differenza tra singole coppie, per esempio tracciando le linee che uniscono i dati appaiati.

La regressione lineare standard richiede che i punti dati siano indipendenti (misurazioni ripetute non sono indipendenti). La variabile indipendente (come ad esempio l'età o il tempo) deve essere misurata senza errori significativi, e i punti dovrebbero essere distribuiti uniformemente su tutta la gamma e non avere valori anomali (questo può essere facilmente esaminato con un grafico di dispersione). Questi requisiti sono raramente soddisfatti dai dati biologici.

Il confronto tra metodi utilizzando la regressione e i coefficienti di correlazione è insufficiente e deve essere associato al diagramma di Bland e Altman (4).

Bibliografia

1. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al., for the STARD Group. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Ann Clin Biochem* 2003;40:357-63.
2. Moher D, Schultz KF, Altman DG, for the CONSORT Group. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* 2001;357:1191-4.
3. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall, 1991.
4. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8476:307-10.

biochimica clinica

Biochimica Clinica publishes papers on all aspects of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Both Italian and English languages are accepted.

At the Author request or in the judgement of the Editor, papers are published in the following sections of the Journal:

- Reviews
- Scientific Papers
- Opinions
- Documents
- SIBioC Documents
- Case Reports
- Letters to the Editor
- SIBioC News

The following rules must be strictly observed, otherwise manuscripts cannot be submitted to the editorial process.

Papers to be published in sections other than Scientific Papers do not need division into the parts listed below. Papers submitted as Letters to the Editor should be 1200 words (or less), in length, should include only one table or figure and no more than 12 references. Letters to the Editor do not require an Abstract.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Experimental papers should include the following sections, in this order:

Title: should be concise but informative and it should not include abbreviations.

Author(s): name and surname (in full), correct affiliation.

Abstract (in English, not exceeding 250 words): should be preceded by the title in English if the paper is in Italian.
An abstract in Italian is not required.

Introduction: short description of the area under research with references to the relevant literature. It should also include the aim of the paper.

Materials and Methods: describe exhaustively population or clinical cases, reagents, diagnostics kits, calibrators, control materials, analytical instruments and systems, analytical methods, statistical methods. If commercially available analytical reagents and systems are used, just indicate the principle of the method and the commercial analytical system. When using statistical methods, please follow the indications reported at the end of these Instructions. In case of studies with human subjects it is compulsory for the Author(s) to declare (to be included in the text) that the study has been carried out according to the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 1996 (http://www.wma.net/e/humanrights/policy_meetings.htm). If biological samples have been specifically collected for the study, an Informed Consent from all subjects (patients) is needed and has to be documented in the paper.

Results: must be reported concisely, in a logical sequence reflecting the aim of the study, with precise reference to the included tables and figures. Measurements must always be accompanied by the proper units. The results can be reported in tables (if the focus is on the number's detail, or if they are observations/descriptions) or in figures/graphs (when a quick global evaluation is important, or when there is no other possibility). For the same group of data use either one or the other procedure, **not both**.

Tables: must be arranged in rows and columns; each column should have a clear heading including units of the measurement. Each table should be prepared on a page separated from the text: the related legend, preceded by the table number, must be reported at the top of the page. The legend should be concise but informative as in the following example: "*Table 1. Data of the different groups studied*". Tables must be numbered consecutively using Arabic numerals, starting from 1, according to the order in which they are mentioned in the text.

Figures: must be black and white, of such a graphic quality as to allow a direct reproduction, taking into account the inevitable reduction. Photos, even if sent in colour, will be reproduced in black and white; for this reason they should be of a very high resolution. In case of graphs of various kinds, a correct representation and a correct expansion of axes are necessary. A computerized composition is strongly recommended, using a suitable software. Figures must

be numbered consecutively using Arabic numerals, starting from 1, according to the order in which they are mentioned in the text. Each figure should be accompanied by a legend. All legends, preceded by the number of the related figure, must be reported on a different page, separated from the figures, and included at the end of the manuscript with the title "Legends of figures".

Discussion: the meaning of the results obtained should be discussed with regard to the aim of the paper, to the hypotheses reported in the literature, to the hypotheses issued in the paper, and to possible concordances or discordances to already published observations. Report hints of clinical and/or analytical interpretation of results. End with a short conclusion, mentioning if the aim of the paper has been achieved or not, and the possible practical significance of obtained results.

The paper should be written in a concise but not telegraphic style, language should be appropriate and clear (cf. Ceriotti G, Ceriotti F, Franzini C. How to write a scientific paper. *Biochim Clin* 2008;38:196-203). Avoid jargons. Non-native English speakers should have their manuscript proofread by a native speaker before submitting it.

Abbreviations must be reported in brackets, after the expression in full, when they first appear in the text (except those in standard usage and non-ambiguous, listed below in these Instructions).

Units must be correct and rational. Use the litre ("L") as the denominator uniformly, both in the text and in the iconography, for concentration units (mass, substance, activity, number). Figures should be reported with a consistent number of relevant digits, according to the variability of the measurements; the decimal digits should be separated by a comma (in text, tables and figures!) if the paper is in Italian and by a point if it is in English.

References: should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, starting from 1. The sequence number must appear in the text (in parentheses) where appropriate. References must be reported according to the following format, paying attention to the correct punctuation marks.

1. Soper CPR, Bending MR, Barron JL. An automated enzymatic insulin assay, capable of full sinistrin hydrolysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:497-501.
2. Barrati J, Ettalbi M. Thermostable insulinases from *A. ficcum*. In: Fusch A, ed. *Insulin and insulin-containing crops*. London: Elsevier Science Publisher, 1993:211-6.
3. Constantin E, Schnell A, eds. *Mass spectrometry*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1991.

For each reference indicate the names of all the Author(s) in full. If Authors are more than three, report the first three followed by "et al."

Web site citations should include the date (month/year) of the last visit: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm> (accessed December 2012)

ELECTRONIC SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Only manuscripts submitted electronically are considered. The submitted papers should be sent as e-mail attachments to the Editorial Office (see below).

For the text, use preferably MS Word or other compatible softwares. Use "Times New Roman" type, size 12. Number all pages consecutively from the title page (page 1); use A4 format sheets, line space should be 1.5 and the four side margins 2.5. Do not justify, avoiding headings (titles, subtitles) in formats different from the text.

Important: Keep a copy of all files sent.

LAYOUT

Text and Tables

Page 1. Report: a) Title; b) Author(s) in the chosen order, name followed by surname, each of them with first name in full; c) Affiliation(s), with a progressive number in apex as a reference to the Author(s) if they are present in more than one affiliation; d) name and complete address (including telephone, fax, e-mail) of the Author to whom the correspondence should be sent.

Page 2. Abstract in English.

Page 3 and following (all numbered consecutively). Report in this order: a) Introduction; b) Materials and Methods; c) Results; d) Discussion; e) Acknowledgements; f) References; g) Tables (one table per page, each with its own legend); h) Legends of the figures (all on one page), headed by the number of the figure in the format: "Figure 1. ..."

Figures

Set up diagrams (e.g. by MS Power Point) writing numbers, letters and symbols of experimental points (in Arial type) of a size to be readable after reduction. Send each figure in a single file, named by the figure number (figure 1, figure

2, etc.), without legend or title. In case of more than one graph being grouped in one figure, send more files as well, naming them figure 1a, figure 1b, etc. Send more complex figures (i.e. photos, chromatograms, etc.) in single files format, named with the figure number, suitable for electronic transmission (e.g. jpeg).

ACCOMPANYING LETTER

This must be submitted in electronic format; it should report the manuscript title, Author(s) and their affiliation. It must be signed by the corresponding Author, whose address must be clearly indicated, including telephone and fax numbers, and e-mail address. All the Authors and the Director of the Institution to which the Authors belong should declare that they agree with the submission of the paper and approve its content. The Author can indicate in which section of the Journal they wish his/her manuscript to appear. The Author can also indicate one or more possible reviewers. Finally, a declaration for the Conflict of Interest should be submitted. The corresponding form is available on the journal website (www.bc.sibioc.it).

REVISION AND ACCEPTANCE

The Editor has the right to accept or not the submitted papers after consulting highly qualified external reviewers. Changes in style or in language both in text and in iconography may be made directly by the Editorial Office and approved by the Author(s) when proof-reading.

OFFPRINTS

The corresponding Author will receive a pdf file of his article, once it has been published. He/she will make copies for co-author(s). Usually, offprints are not sent; however they can be ordered at a price by the corresponding Author.

ADDRESS TO WHICH PAPERS SHOULD BE SENT

e-mail: biochimica.clinica@sibioc.it

Redazione di Biochimica Clinica

Telephone 0245498282 ext. 216; fax 0245498199

ABBREVIATIONS

The abbreviations in this list should be used in this text without definition in full:

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

STATISTICAL GUIDELINES

These guidelines are designed to help Authors to prepare statistical data for publication and are not a substitute for the detailed guidance required to design a study or perform a statistical analysis. Each section of a scientific paper is addressed separately.

Abstract: the number and source of data must be stated and conclusions which have a statistical basis must be substantiated by inclusion of pertinent descriptive statistics [mean or median, standard deviation (SD) or interquartile

range, percentage coefficient of variation (%CV), 95% confidence limits, regression equations, etc.].

Methods: experimental design, subject selection and randomization procedures should be described and analytical accuracy quoted when appropriate. The hypothesis to be tested by a statistical procedure must be stated and where appropriate power calculations for the sample size used should be given (it is recommended that the power is >80%). In case-control studies, clearly define how cases and controls were selected and what matching has taken place. Statistical tests should be described, but need not be referenced unless they are unusual or are applied in a non-standard way. Computer software used should be referenced.

If the paper is reporting the results of a diagnostic trial read the STARD statement (1) and for a clinical trial read the CONSORT statement (2) to improve the quality of the report.

Results: Rounded figures are easier to compare and extra decimal places are rarely important. Descriptive statistics require an additional digit to those used for the raw data. Percentages should not be expressed to more than one decimal place and not be used at all for small samples.

Normally distributed data should be described using a mean, SD and/or %CV and expressed as »mean (SD)« not »mean \pm SD«. When data are not normally distributed, following demonstration by tests such as the Shapiro-Wilk test (3), then medians and interquartile ranges should be used in place of mean and SD. Skewed data can often be normalized by logarithmic transformation or a power transformation. The statistical analysis and calculation of summary statistics should be carried out on the transformed data and the summary statistics transformed back to the original scale for presentation. If a logarithmic scale is used, then graphs should display non-transformed data on a logarithmic scale.

Graphs showing data of comparable magnitude should be of similar size and design. All individual points should be displayed where possible by displacing overlapping points. Error bars showing the standard error of the mean (SE) or interquartile range, as appropriate, can be used to aid the interpretation of data.

The results of significance tests, such as Student's and chi-squared, should be presented with descriptive statistics, degrees of freedom (if appropriate) and probability P. The validity of any assumptions should be checked (e.g. conventional t-tests assume a normal distribution and equal variance for each set of data). For 2 \times 2 contingency table analysis by the chi-squared test the continuity correction must be applied, and for small expected frequencies Fisher's exact test used.

P values should be reported in full with 1 or 2 significant figures. Describing P values as >0.05 or NS (not significant) should be avoided. If the results are highly significant and the calculated P value from the computer is e.g. 0.000, then the use of P <0.0005 is acceptable. Confidence intervals should be stated, particularly for non-significant results.

The conventional use of statistical significance is P \leq 0.05. If a different significance level needs to be used, then reasons for this must be clearly stated in the statistical method section.

Discussion: statistical significance should not be equated to clinical importance and P values should not be compared between different statistical tests. Association should not be interpreted as causation without additional evidence.

Problem areas: multiple comparisons can produce spurious and misleading significance values. The primary hypothesis should always be clearly stated and associations detected by retrospective analysis should be interpreted with caution. Whenever possible a single overall statistical test should be applied, e.g. ANOVA. If this is not significant, then multiple comparisons must not be applied. If it is significant then some form of multiple range test can be applied. If a single overall test is not possible, then multiple comparisons must use a Bonferroni type significance level.

With paired data differences between individual pairs of data and the variability of the differences are more important than the individual values. Graphical presentation should also show the difference between individual pairs, e.g. by plotted lines joining the paired data points.

Standard regression analysis requires data points to be independent (repeated measurements are not independent). The independent variable should be measured without significant error, e.g. age or time, and the points should be evenly distributed over the range and have no outliers (this can be easily examined with a scatter plot). These requirements are rarely satisfied with biological data.

Method comparison using regression and correlation coefficients is not enough and should be associated to Altman and Bland difference plots (4).

References

1. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al., for the STARD Group. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Ann Clin Biochem* 2003;40:357-63.
2. Moher D, Schultz KF, Altman DG, for the CONSORT Group. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* 2001;357:1191-4.
3. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall, 1991.
4. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;8476:307-10.

Cari Soci e Lettori,

Da questo numero del 2108, ha inizio la mia attività di Direttore di *Biochimica Clinica*.

Ringrazio di cuore Marcello Ciaccio, attuale Past President della Società, Sergio Bernardini, Presidente in carica per il prossimo biennio e il Consiglio Direttivo tutto per la fiducia accordatami nel proporre il mio nome per questo incarico. Ho accettato questa nuova sfida professionale con entusiasmo, ma anche con qualche apprensione per l'impegno che il ruolo richiede. I Direttori che mi hanno preceduto – da Norberto Monatalbetti che ha fondato il giornale, a Carlo Franzini che l'ha guidato con lungimiranza per tanti anni, a Mauro Panteghini che l'ha condotto ai traguardi di eccellenza che tutti i lettori apprezzano e riconoscono – impongono infatti che il livello culturale raggiunto dalla nostra rivista venga mantenuto inalterato per non tradire la passione e l'impegno che queste grandi figure della Medicina di Laboratorio Italiana e non solo, hanno dedicato al giornale e alla sua crescita in questi anni.

Ritengo peraltro che questa mia preoccupazione possa essere mitigata da due considerazioni. Prima di tutto il compito sarà facilitato dalla possibilità di seguire la strada sulla quale Mauro Panteghini ha avviato il giornale, perseguendo durante tutti i fruttiferi 11 anni della sua Direzione, gli obiettivi di qualità che hanno reso possibile la caratterizzazione del giornale come un fondamentale strumento di crescita culturale e professionale per i Soci SIBioC e per i tutti i lettori. In secondo luogo, il giornale può continuare a contare su un gruppo di Editori Associati affiatato e ben collaudato, a garanzia della continuità dello spessore culturale raggiunto dalla rivista.

La direzione di *Biochimica Clinica* è d'altra parte un impegno senza dubbio appassionante per la consapevolezza del ruolo di formazione e di informazione che un giornale scientifico può svolgere all'interno (ma anche all'esterno) della nostra Società con il fine ultimo di promuovere la professione al grado di rilevanza che le è proprio.

Una importante novità del 2018 è costituita dalla istituzione di un International Advisory Board (IAB) ad ulteriore garanzia e tutela della qualità scientifica del giornale, novità di cui peraltro non porto nessun merito, essendo l'IAB stato definito lo scorso anno da Mauro Panteghini e da tutto il gruppo degli Editori Associati. I componenti del Board sono un nutrito numero di colleghi Italiani e Internazionali, professionisti di importante valore scientifico e di provata esperienza professionale che hanno dato la loro disponibilità a partecipare alle attività editoriali e ai quali va il sentito ringraziamento mio personale e di tutto il Comitato degli Editori Associati. Essi sono:

KHOSROW ADELI, *Head and Professor, Clinical Biochemistry, The Hospital for Sick Children, University of Toronto, Ontario Canada*; SERGIO BERNARDINI, *Presidente SIBioC (2018-2019), Professore Ordinario di Biochimica Clinica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Tor Vergata, Roma*; MARCELLO CIACCIO, *Past President SIBioC, Professore Ordinario di Biochimica Clinica, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo, Direttore Dipartimento e UOC Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario di Palermo*; ELEFTHERIOS P. DIAMANDIS, *Head and Professor, Division of Clinical Biochemistry, Department of Laboratory Medicine & Pathobiology, University of Toronto, Canada*; KJELL GRANKVIST, *Professor and Senior Consultant Department of Medical Biosciences, Clinical Chemistry, Umeå University, Sweden*; JFM (HANS) JACOBS, *Medical Immunologist, Radboud University Medical Center, The Netherlands*; ERIC S. KILPATRICK, *Honorary Professor in Clinical Biochemistry Hull York Medical School, UK and Division Chief, Clinical Biochemistry, Department of Pathology, Sidra Medical and Research Center, Doha, Qatar*; MAGDALENA KRINTUS, *Department of Laboratory Medicine, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland*; GIUSEPPE LIPPI, *Professore Ordinario di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Direttore UOC Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona*; HOWARD MORRIS, *Endocrine Bone Research Laboratory, University of South Australia and Clinical Scientist in Chemical Pathology at SA Pathology, Adelaide, Australia*; MARIO PLEBANI, *Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Direttore del Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, e Presidente Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Padova*; SVERRE SANDBERG, *Professor, Department of Global Public Health and Primary Care, University of Bergen, Norway*; ANA-MARIA SIMUNDIC, *Professor of Laboratory Medicine and Head of the Department for Medical Laboratory Diagnostics at the Clinical Hospital "Sveti Duh", Zagreb, Croatia*; JILL TATE, *Senior Scientist, Pathology Queensland Pathology Queensland Brisbane, Australia*; TOMMASO TRENTI, *Direttore Dipartimento Interaziendale Integrato di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera Universitaria e Azienda Ausl, Modena*; CAS WEYKAMP, *Head of the Department of Clinical Chemistry, Queen Beatrix Hospital, Winterswijk, The Netherlands*; MARIA WILLRICH, *Senior Associate Consultant, Laboratory of Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA*; PAUL YIP, *Assistant Professor, Clinical Biochemistry, Toronto General Hospital, Ontario, Canada*.

Concludo con l'invito ad inviare contributi alla rivista, a cominciare dai giovani che si affacciano alla professione (che troveranno nel Comitato degli Editori Associati ampia disponibilità per indirizzare al meglio la preparazione dei loro lavori scientifici), ma includendo i colleghi più esperti, già famigliari con la pubblicazione di articoli in importanti riviste internazionali, che possono in questo modo contribuire alla crescita della rivista, rendendo un prezioso servizio ai Soci.

Augurandomi di poter intraprendere un fruttuoso cammino insieme ai lettori di *Biochimica Clinica*, invio a tutti un caloroso saluto.

Maria Stella Graziani

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

Anna Carobene

Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

ABSTRACT

Biological Variation: theoretical bases and the experience of the EFLM working groups. In laboratory medicine, the test results of a subject vary over the time due to three factors: pre-analytical variation, analytical variation, and intra-individual biological variation (BV) that depends on the subject physiology. Appropriately, quantified and characterized BV data have many applications. Besides the setting of performance specifications, the data can also be used to define significance of change between measurements within a subject, and to assess the utility of conventional population-based reference intervals. Given the importance of BV data, it is clear that the access to them is essential for the clinical laboratory, and that users should be confident that they are well characterized and fit for purpose. To make the data accessible, a BV database has been made available via the Westgard website. However, in recent years, concerns have been raised about the quality of the published BV data. To address some of the concerns, the EFLM Task and Finish Group on Biological Variation has developed the Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist (BIVAC), with the aim to verify whether publications in the field have included all essential elements that may influence the veracity of associated BV estimates. Moreover, to address the need to deliver new reliable data, the EFLM Working Group on BV has designed and initiated the European Biological Variation Study (EuBIVAS) to obtain high-quality BV estimates for the highest possible number of measurands. The aim of this review, in addition to an overview about the theory of BV, is to describe BIVAC rationale and to present new BV estimates obtained by EuBIVAS.

LA TEORIA

Definizione di variabilità biologica

Per variabilità biologica (VB) si intende una componente della variabilità nelle misure di medicina di laboratorio, dovuta alla fisiologia del soggetto osservato. La variabilità complessiva (CV_T) di un dato di laboratorio è infatti data da tre componenti: la variabilità preanalitica, la variabilità analitica (CV_A), e la variabilità biologica intra-individuale (CV_I).

La variabilità preanalitica comprende tutte le fasi di preparazione del soggetto per il prelievo, della raccolta, del trasporto, della conservazione e trattamento del campione biologico. Tale componente, in una buona pratica di laboratorio, dovrebbe essere minimizzata e quindi trascurabile rispetto alla CV_T .

Il CV_A è associato alle caratteristiche analitiche in termini di incertezza di misura, e, se pur tenuto sotto stretto controllo, non può essere completamente

eliminato.

Il CV_I rappresenta la variabilità dovuta a cambiamenti fisiologici della concentrazione del misurando intorno a un valore medio di equilibrio ottimale per l'organismo, che viene chiamato punto omeostatico (1, 2). In aggiunta, se si misura lo stesso misurando su un certo numero di campioni in diversi individui sani, le medie dei risultati dei soggetti non saranno uguali tra di loro. La VB inter-individuale (CV_G) esprime infatti le differenze tra i diversi punti omeostatici per lo stesso misurando in differenti individui, nelle stesse condizioni fisiologiche (1). Per definizione, le componenti di VB non sono né eliminabili né riducibili e sono tipicamente associate a un dato misurando.

Natura della variabilità biologica

Molti misurandi di interesse per la medicina di laboratorio possono variare in concentrazione nel corso della vita di un individuo, semplicemente perché coinvolti

Corrispondenza a: Anna Carobene, Servizio di medicina di laboratorio, Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano. Tel. 0226432850, E-mail carobene.anna@hsr.it

Ricevuto: 11.12.2017

Revisionato: 21.12.2017

Accettato: 28.12.2017

Pubblicato on-line: 25.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.005

nei naturali processi di crescita e invecchiamento. Queste variazioni possono avvenire rapidamente in alcuni momenti particolari del ciclo vitale come per esempio il periodo neonatale, l'infanzia, la pubertà, la menopausa. Altri misurandi possono mostrare concentrazione diverse tra sessi, o tra gruppi etnici diversi. Ma ci sono anche alcuni misurandi che variano in funzione di ritmi biologici o cicli prevedibili (giornalieri, mensili o stagionali). Conoscere l'esistenza di queste variazioni e la loro quantificazione consente una corretta valutazione del dato ottenuto in un particolare momento (2).

La maggior parte dei misurandi però non è soggetta a variazioni cicliche ma a variazioni che possono essere descritte come fluttuazioni casuali intorno a un valore medio. Anche queste componenti di VB dovute al solo fattore omeostatico, senza che intervengano altri fattori quali l'età, il sesso, l'etnia, i ritmi biologici come precedentemente descritto, è opportuno che siano conosciute e quantificate per poter assicurare la corretta valutazione del dato ottenuto e quindi il miglior outcome al paziente.

Utilizzo dei dati di variabilità biologica

I dati di VB, se correttamente definiti, hanno diverse importanti applicazioni nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Sono utilizzati per il calcolo dell'indice d'individualità (II) che consente di valutare l'utilità degli intervalli di riferimento (3), per la valutazione della significatività delle variazioni in misure seriali osservate nel soggetto (differenza critica, DC) (4, 5), per la valutazione del numero di campioni richiesti al fine di ottenere una stima accurata del valore al punto omeostatico di un misurando (2), e per la definizione delle specifiche di qualità analitica ("analytical performance specification", APS) (6).

Valutazione dell'utilità degli intervalli di riferimento: indice di individualità

L'II si ottiene dal rapporto tra il CV_I e il $CV_G(3)$:

$$II = CV_I / CV_G$$

Se $II < 0,6$ l'utilizzo degli intervalli di riferimento ha una limitata sensibilità diagnostica; se $II > 1,4$ gli intervalli di riferimento sono pienamente applicabili.

Tipico è il caso della creatinina che, considerando i dati di $CV_I = 4,4\%$ e di $CV_G = 10,2\%$ di recente pubblicazione (7), presenta un II stimato attorno a 0,43. Per questo parametro quindi, l'utilizzo degli intervalli di riferimento per la valutazione del dato ha una sensibilità molto bassa e può essere fuorviante in quanto un individuo con concentrazione di creatinina nell'ambito inferiore dell'intervallo di riferimento, prima di presentare un valore al di fuori dell'intervallo di riferimento dovrà incrementare la concentrazione della sua creatinina anche del 100%, che comporterebbe un danno renale molto rilevante.

Differenza critica

La DC (nota anche come RCV, dall'inglese "reference change value") indica la differenza minima tra due risultati di misure seriali ottenuti sullo stesso soggetto, che può essere considerata significativa (4, 5). Per il calcolo occorre conoscere il CV_A e il CV_I applicando la formula:

$$DC = \sqrt{2} * Z * \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2}$$

Il parametro Z varia a seconda del livello di probabilità scelto: per probabilità del 95% ($p < 0,05$), $Z = 1,96$; per probabilità del 99% ($p < 0,01$), $Z = 2,58$ (5).

E' importante sottolineare che è possibile utilizzare questa formula per il calcolo della DC solo se la varianza intra-individuale è omogenea. I test statistici utilizzati più frequentemente per verificare l'omogeneità delle varianze sono il test di Cochran e il test di Bartlett (8). Potrebbe quindi non essere corretto utilizzare i dati di VB per il calcolo delle DC in soggetti (ad esempio affetti da una qualche patologia, anziani o in età pediatrica) per i quali non ci sono evidenze che la variabilità intra-individuale sia omogenea con quella dei soggetti sani di riferimento da cui i valori di VB sono stati calcolati. Per il calcolo della DC è anche importante conoscere il CV_A del metodo che si sta utilizzando.

Come esempio possiamo considerare due misure consecutive di creatinina sierica prendendo i valori di CV_A e di CV_I pubblicati di recente: $CV_I = 4,4\%$, CV_A metodo enzimatico = 1,1%, e CV_A metodo Jaffe = 4,4% (7). Per una probabilità del 95% ($Z = 1,96$), i valori di DC che otteniamo saranno i seguenti: $DC_{Enzimatico} = 12,6\%$; $DC_{Jaffe} = 17,2\%$. Questo significa che se consideriamo un paziente con un valore di creatinina sierica di 1,13 mg/dL, possiamo affermare, con una probabilità del 95%, che un aumento fino a 1,27 mg/dL, se misurata con il metodo enzimatico, non è significativo. La differenza osservata tra le due misure in questo caso potrebbe quindi essere spiegata semplicemente dalla VB e dal CV_A . Ma se la misura della creatinina viene effettuata con principio analitico Jaffe, l'incremento di concentrazione che risulta non significativo sale fino a 1,32 mg/dL. Nel calcolare i valori di DC è quindi necessario considerare il CV_A del proprio laboratorio che dipenderà sia dalla strumentazione utilizzata, sia dal reattivo/principio analitico in uso.

Numero di campioni richiesti per stimare il punto omeostatico

Il numero di campioni richiesti per stimare il punto omeostatico (2) di un dato misurando, dipende dal CV_A e dal CV_I secondo la seguente relazione:

$$n = (Z * \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2} / D)^2$$

dove: Z è il numero di deviazioni standard per una probabilità fissata (ad esempio, $Z = 1,96$ per una probabilità del 95%) e D è la percentuale desiderata di

vicinanza al punto omeostatico.

Consideriamo come esempio la misura del colesterolo totale che ha un valore di $CV_I = 6,0\%$ e un valore sperimentale di $CV_A = 3,0\%$. Se vogliamo avere una stima della concentrazione del colesterolo che, con una probabilità del 95%, cada entro $\pm 10\%$ dal reale punto omeostatico del nostro soggetto, il numero di campioni richiesto sarà:

$n = (1,96\sqrt{3^2+6^2} / 10)^2$ da cui $n = 2$. Abbassando la probabilità (quindi il valore di Z) o allargando la finestra di accettabilità (aumentando D), il numero di campioni richiesto diminuirà. Chiaramente, il CV_A gioca un ruolo cruciale anche in questo calcolo. Maggiore sarà l'imprecisione del metodo, a parità di Z e di D, maggiore sarà il numero di campioni richiesto. La desiderata vicinanza al punto omeostatico sarà fissata dal laboratorista in base all'importanza che riveste l'accuratezza nella determinazione dello specifico misurando.

Traguardo analitico

L'obiettivo analitico (o traguardo analitico) (6) per l'imprecisione è definito dal CV_A inferiore o uguale alla metà del CV_I per ciascun parametro di laboratorio:

$$CV_A \leq 1/2 CV_I$$

Tale obiettivo, è stato fissato in modo tale che l'imprecisione analitica non incrementi più del 12% la variabilità totale del risultato, variabilità che dipende dalla VB che, per definizione, non è riducibile.

L'APS per l'imprecisione basata sulla VB è stato definito già nel 1970 (6), e, 30 anni più tardi, furono proposte APS a tre diversi livelli di qualità: minimo, desiderabile e ottimale per l'imprecisione, il bias e l'errore totale (ET), come riportato in Tabella 1 (2, 6). La definizione delle APS in medicina di laboratorio è fondamentale per identificare i criteri che specificano in termini numerici la qualità richiesta dell'esame di laboratorio perché il risultato ottenuto possa soddisfare le esigenze cliniche per la cura del paziente,

assicurando che l'errore di misura non abbia un impatto sul risultato tale da modificare il trattamento del paziente.

Prendendo ancora i dati di VB della creatinina sierica: $CV_I = 4,4\%$ e $CV_G = 10,2\%$ (7), otteniamo i traguardi analitici presentati in Tabella 2.

I dati di imprecisione analitica (CV_A) del metodo enzimatico (1,1%) e Jaffe (4,4%) riportati precedentemente, mostrano che mentre il metodo enzimatico raggiunge il traguardo ottimale dell'imprecisione, il metodo Jaffe non è in grado di raggiungere neanche il traguardo minimo dell'imprecisione pari a 3,3%.

Indice di fiducia

L'indice di fiducia (IF) (9), calcolato come rapporto tra il CV_A e APS per l'imprecisione, indica il grado di affidabilità con cui sono stati ottenuti i dati di VB. Se <1 significa che l'imprecisione del metodo analitico utilizzato soddisfa il traguardo analitico, pertanto i dati sperimentali ottenuti sono affidabili. Se l'indice risulta >1 , significa che i dati sperimentali di VB non sono affidabili in quanto ottenuti con un metodo analitico di precisione non soddisfacente.

In realtà questo indice, introdotto da Fraser et al. nel 1988 (9), non ha trovato grande utilizzo in medicina di laboratorio, tanto è vero che non è in genere citato nelle pubblicazioni scientifiche sulla VB. È importante però menzionarlo perché, con il nome di "indice di performance", è stato utilizzato come uno dei criteri di qualità, considerati da Ricos et al., dei dati di BV disponibili in letteratura, perché fossero inclusi, o meno, nel calcolo della mediana, che è il valore che è riportato nel database on line (10, 11).

Utilizzo della variabilità biologica nella definizione delle APS

Nella conferenza di Stoccolma del 1999, venne stabilita una gerarchia di modelli da utilizzare per calcolare le APS (12). La prima conferenza strategica di EFLM (1st EFLM Strategic Conference), pur supportando

Tabella 1

Specifiche di qualità analitica (2, 6)

| | CV_A | Bias | ET |
|--------------|------------------|-------------------------------------|--|
| Minimo | $\leq 0,75 CV_I$ | $\leq 0,375 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$ | $\leq 1,65 (0,75 CV_I) + 0,375 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$ |
| Desiderabile | $\leq 0,50 CV_I$ | $\leq 0,250 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$ | $\leq 1,65 (0,50 CV_I) + 0,250 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$ |
| Ottimale | $\leq 0,25 CV_I$ | $\leq 0,125 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$ | $\leq 1,65 (0,25 CV_I) + 0,125 \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$ |

Tabella 2

Specifiche di qualità analitica della creatinina sierica ($CV_I = 4,4\%$ e $CV_G = 10,2\%$) (7)

| | CV_A (%) | Bias (%) | ET (%) |
|--------------|------------|----------|--------|
| Minimo | 3,3 | 4,2 | 9,6 |
| Desiderabile | 2,2 | 2,8 | 6,4 |
| Ottimale | 1,1 | 1,4 | 3,2 |

la gerarchia stabilita 15 anni prima ha optato per una semplificazione in tre modelli (13):

Modello 1: basato sull'effetto delle caratteristiche analitiche sull'outcome clinico

Modello 2: basato sulle componenti della variabilità biologica del misurando

Modello 3: basato sullo stato dell'arte della misura, definite come il migliore livello di performance analitica tecnicamente ottenibile.

Il primo modello è suggerito per quei misurandi che hanno un ruolo centrale nel processo decisionale di una specifica malattia o situazione clinica, per i quali i valori soglia e decisionali sono stabiliti per definiti scenari clinici (diagnosi, screening o monitoraggio), e hanno quindi un effetto, diretto o indiretto, sull'outcome clinico del paziente (14). Un esempio di misurandi per i quali si applica il modello 1 sono il colesterolo totale, il glucosio, l'emoglobina glicata, l'albumina sierica, e le troponine cardiache. Il modello 2 dovrebbe essere applicato a quei misurandi che non hanno un ruolo decisionale in una specifica malattia o situazione clinica. Dovrebbe rappresentare la modalità più affidabile per definire le APS per la maggior parte di misurandi (14, 15). Il modello 3, basato sullo stato dell'arte della misura, dovrebbe essere usato per tutti quei misurandi che non possono essere inclusi nei modelli 1 o 2.

Come si ottengono i dati di VB

Un corretto esperimento per il calcolo di stime di VB è veramente impegnativo, in quanto deve considerare un importante numero di variabili (illustrate nella [Figura 1s](#) del materiale supplementare). Considerando la complessità e varietà delle variabili in gioco, vengono qui elencate solo le principali; tale elenco quindi non deve essere considerato esaustivo:

- Selezione della popolazione: numero di soggetti, criteri di inclusione/esclusione per l'arruolamento, numero e tipo di classi di soggetti divisi per sesso, età, etnia;
- Approvazione del comitato etico e consenso informato del volontario;
- Definizione del protocollo: numero di raccolte per soggetto e tipi di matrici dei campioni raccolti, frequenza dei prelievi, durata totale dello studio;
- Fase pre-analitica: standardizzazione nella raccolta dei campioni (modalità del prelievo, tempi di centrifugazione, temperatura di conservazione dei campioni);
- Fase analitica: numero di replicati, precisione del metodo analitico, numero di serie analitiche, controlli di qualità;
- Fase statistica di elaborazione dei dati: l'eliminazione degli outliers a tre livelli (tra replicati, nel soggetto e tra soggetti), deve precedere ogni analisi statistica dei dati. Una volta eliminati gli outliers è importante verificare le normalità di distribuzione dei dati e, qualora non lo fossero, trasformarli (per esempio logaritmicamente) per poi riverificarne la normalità. Anche la verifica di eventuali linee di tendenza nel soggetto e nel valore

medio tra soggetti (verifica del così detto "stato di steady-state"), è un dato importante da considerare. Qualora si riscontri un trend significativo, è plausibile che durante l'esperimento, un fattore esterno, diverso dalla VB, abbia influito sui risultati. In questi casi è opportuno correggere i dati per la linea di tendenza osservata. Infine si può procedere con l'analisi della varianza per il calcolo delle diverse componenti di variabilità.

Nel 1989 Fraser et al. hanno pubblicato una linea guida per la produzione dei dati di VB (16) e nel 2015 il gruppo di lavoro di EFLM (WG-VB) ha prodotto una lista di controllo che consente di valutare correttamente e obiettivamente gli studi che presentano stime di VB (17). Di ancora più recente pubblicazione, la rassegna di Braga et al. (1) ripercorre la linea guida di Fraser (2), aggiornandola e integrandola con alcuni esempi, per facilitare i ricercatori nell'eseguire un esperimento di VB in accordo con le raccomandazioni, e per la produzione della relativa pubblicazione scientifica.

LA PRATICA

Dati attualmente disponibili

Considerando l'importanza dei dati di VB, è evidente che risulta essenziale per il laboratorio clinico poterne usufruire. Già nel 1992 Fraser aveva pubblicato un primo elenco, includendo dati sperimentali ottenuti tra il 1988 e il 1991, rendendolo così disponibile per gli specialisti di medicina di laboratorio (18). Nel 1999 Ricos et al. (19) hanno pubblicato un database che includeva dati di VB per misurandi di chimica clinica e di ematologia che è poi diventato il database più noto di VB; tali valori aggiornati ogni due anni, sono anche disponibili sul sito di Westgard (10). Questo database riunisce dati di VB che derivano da più di 240 pubblicazioni e presenta dati di VB e le APS derivate per l'imprecisione, il bias e l'errore totale relative a più di 350 misurandi. Recentemente, Perich et al. (11), hanno pubblicato i criteri utilizzati per includere o meno i valori di VB riportati nelle pubblicazioni scientifiche nel calcolo delle mediane che rappresentano le stime di VB pubblicate nel database on line (10).

Limiti dei dati attualmente disponibili

Negli ultimi anni, alcune pubblicazioni scientifiche hanno evidenziato i limiti di alcuni dati di VB attualmente disponibili sul database on line, sottolineandone la non affidabilità (20-23). Queste carenze possono essere attribuite a diversi elementi: dalla variabilità dei fattori metodologici associati alla produzione dei dati di VB che influenzano la qualità delle osservazioni, fino alla variabilità della popolazione studiata in termini di età, genere, stato di salute, stato di "steady state" (20). Peraltro, con l'eccezione di una minoranza di misurandi comuni, i dati di VB attualmente disponibili sono originati principalmente da un numero limitato di pubblicazioni scientifiche, anche datate, che potrebbero avere utilizzato per le analisi di laboratorio metodi

analitici che allo stato attuale sono considerati obsoleti, oppure, metodi che hanno subito nel tempo modificazioni di sensibilità e specificità analitica. Sono stati rilevati inoltre limiti legati alla mancanza d'informazioni sui disegni sperimentali, o alla loro inadeguatezza, e all'analisi statistica dei dati (20-23).

Due progetti di EFLM

La EFLM, considerando la notevole importanza che riveste la VB in medicina di laboratorio e la messa in luce della scarsa affidabilità dei dati di VB attualmente disponibili, ha costituito due gruppi di lavoro di cui, in questa rassegna, riassumiamo i lavori. Prima di addentrarci nello specifico, è opportuno descrivere brevemente la federazione scientifica e la sua missione (24).

La EFLM, nata durante il congresso europeo di Amsterdam del 2007, mette in connessione società scientifiche nazionali, attualmente da 40 paesi, di chimica clinica e di medicina laboratorio e gli specialisti di medicina di laboratorio loro affiliati. La missione di EFLM è il miglioramento della professione, promuovendo e migliorando gli aspetti scientifici, professionali e clinici della chimica clinica e medicina di laboratorio. La EFLM ha cinque comitati operativi (Comunicazione, Istruzione e Formazione, Professione, Qualità e Regolamenti, Comitato Scientifico) ognuno dei quali è a sua volta articolato in gruppi di lavoro. Tra i 9 gruppi di lavoro del comitato scientifico, è presente da diversi anni anche il gruppo "Variabilità Biologica" (WG-VB). I gruppi di lavoro della EFLM hanno come scopo quello di produrre risultati scientifici, documentabili in pubblicazioni che sono accessibili dal sito (24).

Oltre ai comitati sopra menzionati, come risultato della sua prima Conferenza Strategica tenutasi a Milano nel 2014, la EFLM ha introdotto di recente anche una "Task Force" sugli obiettivi analitici in Medicina di Laboratorio (15). La "Task Force" è suddivisa a sua volta in 5 gruppi di lavoro ("Task and Finish Group"), di cui uno è stato creato con l'intento di generare un nuovo database di VB (TFG-BVD), che verrà reso disponibile direttamente sul sito della EFLM, allo scopo di aggiornare le stime di VB includendo solo le pubblicazioni di alto livello di qualità (15, 25). In accordo con il regolamento della EFLM, i 5 gruppi di lavoro avrebbero dovuto terminare il loro mandato in due anni e infatti i più importanti risultati ottenuti sono già stati pubblicati (25). Tuttavia, considerando l'entità del lavoro necessario per il rinnovo del database e per il suo aggiornamento, che dovrà essere effettuato periodicamente, il TFG-BVD è stato di recente trasformato dalla stessa EFLM in un gruppo permanente (26).

Nuovo database di VB, progetto della "Task Force on Biological Variation Database" (TFG-BVD) di EFLM

Il gruppo TFG-BVD, è costituito da tutti i componenti della società scientifica spagnola di medicina di

laboratorio (27) che avevano ideato, e aggiornato ogni due anni dalla sua prima pubblicazione, il database disponibile sul sito di Westgard (10), e da tutti i componenti del WG-VB già esistente (28). Il gruppo si è a sua volta suddiviso in 4 sottogruppi operativi che si sono occupati di valutare e classificare le pubblicazioni disponibili in letteratura, che presentassero dati di VB, rispettivamente per lipidi, enzimi, metaboliti e analiti correlati alla funzionalità renale.

Valutazione dei manoscritti e meta-analisi per il calcolo delle nuove stime di VB. Le valutazioni dei manoscritti sono state eseguite in base a una accurata lista di controllo denominata BIVAC ("The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist") che comprende 14 parametri di qualità riassunti in Tabella 1s del materiale supplementare (8).

Uno studio viene classificato come "A, B, C o D" in accordo con il grado di qualità che gli viene attribuito per ognuna delle 14 voci considerate. Un lavoro è considerato di qualità "A" (ottima qualità) se tutte le 14 voci sono classificate "A" (pienamente rispondenti ai criteri di qualità), viene considerato di classe "B" (buona qualità) anche se una sola voce su 14 è risultata B, come "C" (sufficiente) anche per una sola voce giudicata tale, e come "D" (inaccettabile) se anche una sola voce viene giudicata come tale (8). Il manoscritto classificato come B, o come C, presenterà oltre alla lettera che indica il grado di qualità assegnatogli, anche dei numeri a pedice che indicano quali dei 14 parametri sono stati classificati con quella lettera. Ad esempio, un manoscritto classificato B₃ indica che a parte la voce n° 3 classificata B, tutte le altre voci sono state giudicate A, mentre un manoscritto C_{8,13} indica che le voci 8 e 13 sono state classificate come C, mentre tutte le altre voci sono state giudicate A o B. I dati di VB pubblicati sui lavori classificati come "D" non vengono inclusi nelle nuove stime di VB che deriveranno invece da una meta-analisi tra tutti i dati di VB giudicati idonei e cioè di classe A, B e C.

Nel calcolo delle nuove stime di VB, la meta-analisi considera due diversi fattori: la qualità dello studio che li ha prodotti (misurata come A, B, e C) e l'ampiezza dell'intervallo di confidenza (IC) intorno ai dati, che è il migliore indice della variabilità delle stime di VB, in quanto dipende dal numero di soggetti arruolati, dal numero di campioni per soggetto, e dal CV_A. Un numero basso di soggetti e di campioni, e un elevato CV_A renderanno più ampio l'IC, e di conseguenza minore l'affidabilità della stima di VB. Nella meta-analisi viene usato come peso l'inverso della ampiezza degli IC. Il secondo fattore che viene considerato nella meta-analisi è il grado di qualità che è stato attribuito al manoscritto, che, arbitrariamente, viene pesato nel seguente modo: A=4, B=2, C=1. Infine, per provvedere alla stima finale, viene considerata la mediana pesata (8).

Nel calcolo delle nuove stime, vengono inclusi solo i dati di VB che derivano da soggetti sani e da campionamenti di una frequenza che sia almeno settimanale.

Risultati della valutazione dei primi 117 articoli. In Tabella 3 vengono mostrati i risultati relativi alla valutazione dei

Tabella 3

Valutazione di 117 studi contenenti stime di VB per lipidi, enzimi, misurandi correlati al diabete e alla funzionalità renale utilizzando la lista di controllo BIVAC. Percentuale degli studi classificati come A, B o C. Per gli studi in cui sono stati valutati più misurandi, è stato conteggiato arbitrariamente un solo punteggio. Gli studi che sono stati classificati come "D" per tutti i misurandi valutati (n=11), sono stati esclusi. I quesiti sono quelli riportati in [Tabella 1s](#)

| | Quesito | A % | B % | B % |
|----|-------------------------------------|--------|--------|--------|
| 1 | Scala | 94 | 6,0 | - |
| 2 | Soggetti | 88 | 6,8 | 5,1 |
| 3 | Campioni | 88,9 | 8,5 | 2,6 |
| 4 | Misurando | 89,7 | 6,8 | 3,4 |
| 5 | Procedure pre-analitiche | 80,3 | 13,7 | 6,0 |
| 6 | Stime di variabilità analitica | 50,4 | 40,2 | 9,4 |
| 7 | Stato stazionario | 28,2 | 64,1 | 7,7 |
| 8 | "Outliers" | 22,2 | 11,1 | 66,7 |
| 9 | Normalità di distribuzione dei dati | 8,5 | 91,5 | - |
| 10 | Omogeneità della varianza | 17,9 | - | 82,1 |
| 11 | Metodi statistici | 45,3 | 41,0 | 13,7 |
| 12 | Limiti di confidenza | 76,1 | - | 23,9 |
| 13 | Numero dei risultati inclusi | 32,5 | 6,8 | 60,7 |
| 14 | Valori medi di concentrazione | 82,9 | 17,1 | - |

Modificata da rif. 8.

primi 117 articoli, per i misurandi esaminati dai sottogruppi operativi (lipidi, enzimi, metaboliti e analiti correlati al diabete e alla funzionalità renale).

La maggior parte dei manoscritti è stata valutata di qualità sufficiente (punteggio C); come è evidente dalla tabella, le voci con una maggior criticità sono quelle corrispondenti alla elaborazione statistica dei dati. In particolare, le voci 8 (eliminazione degli "outliers"), 9 (normalità della distribuzione dei dati) e 13 (numero dei risultati inclusi) sono risultate le più critiche, con rispettivamente più del 70%, 80% e 60% dei manoscritti che non soddisfacevano il criterio di qualità.

Esempio di valutazione e meta-analisi per il calcolo della stima di CV_I per l'alanina aminotransferasi (ALT). Per tutte le attività enzimatiche la percentuale dei manoscritti esclusi dalla meta-analisi perché classificati D, è risultata molto alta, superiore al 70%. La ragione di questa esclusione è dovuta quasi interamente al misurando (quesito 4) che deve essere identificabile da una descrizione accurata e completa del metodo analitico, e dalla procedura analitica che non deve essere considerata obsoleta, ma riconosciuta in uno dei metodi analitici attualmente in uso. Come messo in evidenza da Carobene A et al. (21), per ALT, aspartato aminotransferasi (AST) e gamma glutamil transferasi (GGT) i dati presenti in letteratura sulla VB, con un'unica eccezione per una pubblicazione per GGT (29), sono molto datati e pubblicati prima che i metodi di misura per le attività enzimatiche fossero ottimizzati dalla IFCC.

Per ALT sono stati identificati e valutati 23 articoli. Un solo articolo è stato classificato B, sei C, e 16 sono stati

classificati come D e quindi non inclusi nella meta-analisi. In Tabella 4 vengono mostrate come esempio le valutazioni dei 7 manoscritti considerati eligibili. I valori di VB di cinque dei sette manoscritti non sono tuttavia stati inseriti nella meta-analisi per il calcolo della nuova stima di CV_I; uno studio riporta stime di VB ottenute in soggetti in età pediatrica (30), in altri due studi il campionamento era di frequenza considerata non adeguata perché non settimanale (31, 33), e in altri due i dati presentati erano esattamente gli stessi (34, 35) per cui è stato inserito solo uno dei due. Quindi, per il calcolo della nuova stima di CV_I, sono stati considerati solo i dati riportati in due manoscritti (35, 36). Le stime di VB in entrambi gli studi sono riportate separatamente per maschi e femmine, con un CV_I comune per tutti i soggetti rispettivamente di 15,2% (IC 13,7-17,0) (35) e di 15,7% (IC 12,4-17,2) (36). Dalla combinazione dei due CV_I si ottiene la nuova stima di 15,4% (range 15,2-15,7).

Nuovo database sul sito della EFLM. Il nuovo database, che sarà disponibile a breve sul sito EFLM (37), oltre alle nuove stime di VB, ottenute dalla meta-analisi con le modalità precedentemente illustrate e presentate con IC al 95%, conterrà anche le APS per il bias e l'imprecisione nonché i valori di DC. Sarà inoltre possibile accedere alle schede di valutazione degli articoli per ogni singolo misurando, verificare il grado di qualità con cui è stato giudicato il singolo manoscritto, visualizzare nel dettaglio il punteggio di tutte le 14 voci considerate, e, infine, verificare per ogni articolo se i dati di VB sono stati inclusi o meno nella meta-analisi. Per ogni studio saranno disponibili le informazioni relative ai

Tabella 4

Classificazione degli studi di variabilità biologica (VB) sull'alanina aminotransferasi sierica (ALT) utilizzando la lista di controllo BIVAC e relative stime di CV₁. Le pubblicazioni che hanno ricevuto almeno un D tra le varie voci considerate, non sono incluse. Le stime di VB intraindividuale (CV₁) derivano da popolazioni di soggetti sani, e sono fornite separatamente tra maschi e femmine, qualora tali differenze siano riportate. I quesiti sono quelli riportati in *Tabella 1s*

| Riferimento bibliografico | Quesito | | | | | | | | | | | | | | Punteggio finale | Intervallo di campionamento | CV ₁ (95% CI) |
|---------------------------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----------------------------|-----------------------------|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | |
| Statland BE, 1973 (31) | A | A | A | C | A | A | B | C | B | C | B | A | C | A | C _{4,8,10,13} | 3 giorni | 6,7 (4,7-9,9) |
| Winkel P, 1974 (33) | A | A | A | C | A | A | B | C | B | C | A | C | C | A | C _{4,8,10,12,13} | 2 settimane | 26,4 |
| Hölzel WGE, 1987 (34) | A | A | A | C | B | A | B | C | A | A | B | A | C | A | C _{4,8,13} | 1 settimana | F: 15,7 (13,7-18,4) M: 14,4 (12,2-17,4) |
| Hölzel WGE, 1987 (35) | A | A | A | C | B | A | B | C | A | A | B | A | C | A | C _{4,8,13} | 1 settimana | F: 15,7 (13,7-18,4) M: 14,4 (12,2-17,4) |
| Pineda-Tenor E, 2013 (36) | A | A | A | A | B | B | B | C | B | A | B | A | C | A | C _{8,13} | 1 settimana | F: 17,3 (15,3-19,5) M: 14 (12-16) |
| Bailey D 2014, (30) | A | A | A | A | A | B | B | B | B | A | B | A | B | A | B _{6,7,8,9,11,13} | 4 giorni | 15,6 (11,8-18,9) |
| Qi Z 2016, (32) | A | A | A | A | A | A | B | C | A | C | A | A | A | A | C _{8,10} | 1 giorno | 3,57 (3,2-4,1) |

Modificata da rif. 8.

dati originali (popolazione selezionata, sesso, età, principio analitico e strumento utilizzato, durata dello studio, intervallo di campionamento, numero di campioni, concentrazione del misurando, etc.) e sarà anche possibile accedere direttamente alle pubblicazioni.

Studio Europeo di Variabilità Biologica (EuBIVAS), progetto del Working Group on BV di EFLM (WG-VB)

La necessità di superare le perplessità sulla qualità di alcune pubblicazioni di VB e quindi sulla conseguente scarsa affidabilità dei dati di VB in questo momento disponibili (20), ha spinto il WG-BV alla ideazione di un progetto multicentrico di raccolta campioni con lo scopo di verificare (o ridefinire) le stime di VB attualmente in uso.

EuBIVAS, studio europeo di variabilità biologica (38-39), è un progetto ad approccio multicentrico pensato per arruolare un rilevante numero di soggetti, con la concreta possibilità quindi di raccogliere un importante numero di campioni. Il numero elevato di soggetti permette di ottenere un alto potere statistico delle stime di VB (40), anche qualora la VB di uno specifico misurando fosse sesso o età dipendente (41) e quindi risultasse necessario calcolare le stime di VB per sottogruppi.

Le caratteristiche di EuBIVAS, riportate nel dettaglio da Carobene A. et al. (42), vengono qui descritte

sommariamente. EuBIVAS ha coinvolto 6 laboratori Europei che hanno arruolato 91 volontari sani (38 maschi e 53 femmine, 10 delle quali in menopausa). Per l'arruolamento dei soggetti e per la fase preanalitica, è stato seguito un protocollo comune che dettaglia la fase preanalitica in ogni suo passaggio. I volontari hanno compilato un questionario di arruolamento per la verifica del loro stato di salute e sullo stile di vita, e un questionario in forma ridotta durante tutte le singole raccolte. Ulteriori fattori di esclusione sono stati verificati mediante alcuni esami di laboratorio effettuati durante le raccolte. I campioni di sangue (siero, plasma EDTA e plasma citrato) sono stati raccolti per 10 settimane consecutive (Aprile – Giugno 2015), trattati con le stesse modalità operative, suddivisi in aliquote e congelati a -80 °C. Una volta terminata la raccolta, i campioni sono stati spediti in ghiaccio secco al centro coordinatore (Ospedale San Raffaele, Milano) dove sono conservati a -80 °C in un freezer dedicato fino all'esecuzione delle analisi. EuBIVAS è stato approvato dal comitato etico del San Raffaele e da tutti i comitati etici dei laboratori partecipanti (42). Durante la prima fase del progetto EuBIVAS, i campioni di siero raccolti sono stati misurati utilizzando un analizzatore ADVIA2400 (Siemens Healthcare) per i più comuni misurandi di chimica clinica (7, 43-45).

La seconda fase del progetto riguarda gli esami di coagulazione più comuni (tempo di tromboplastina parziale attivata, tempo di protrombina, fibrinogeno), gli inibitori della coagulazione (antitrombina, proteina C e

proteina S) e il D-dimero su campioni di plasma citrato.

La terza fase del progetto riguarderà alcune proteine plasmatiche e, più in generale, misure con metodiche immunochimiche con le determinazioni pianificate per il primo semestre del 2018.

Nuove stime di VB. Alcuni esempi

Fino ad ora, il database online (10), presentava un solo valore di VB per misurando, ottenuto come mediana di diversi dati di VB ricavati da diversi esperimenti (11) senza alcuna verifica di omogeneità delle numerosissime variabili inevitabilmente coinvolte in uno studio di VB (vedi Figura 1s). I valori di VB nel database sono inoltre presentati senza IC, per cui è impossibile conoscere il grado di incertezza di tali valori, che vengono pertanto utilizzati come valore esatto sia per il calcolo delle DC sia per il calcolo delle APS.

L'elevata numerosità di soggetti arruolati in EuBIVAS, ha permesso invece di verificare la presenza o meno di differenze significative tra sottogruppi di popolazione come tra maschi e femmine, femmine in menopausa o età fertile, o tra soggetti di diversi paesi di provenienza (7, 43-45).

Differenze sottogruppi maschi-femmine

Per alcune attività enzimatiche [ALT, GGT e creatin chinasi (CK)], si sono trovate differenze significative tra i valori medi dei sottogruppi maschi e femmine (43). Tali differenze, peraltro attese, considerando che questi enzimi hanno intervalli di riferimento sesso-dipendenti, precludono la possibilità di calcolare i CV_G da un unico gruppo di soggetti non omogenei tra di loro, e comportano pertanto il calcolo di due differenti CV_G . In questi casi, per il calcolo delle APS per il bias, che nella formula contiene anche il valore di CV_G , si è deciso di utilizzare il valore di CV_G più basso tra i due. La differenza significativa tra valori di concentrazione tra maschi e femmine non è peculiarità delle attività enzimatiche ma anche di altri misurandi come creatinina, lipidi e alcuni elettroliti (7, 45). Anche in questi casi si è reso necessario calcolare diverse stime di CV_G sesso dipendente.

Differenze sottogruppi Paese di origine

Un caso particolare è rappresentato dai risultati ottenuti sulla creatinina sierica per la quale, oltre alla differenza attesa tra sessi, è stata riscontrata una differenza significativa tra il valore medio di concentrazione del sottogruppo di soggetti proveniente dalla Turchia, rispetto ai valori ottenuti dai soggetti provenienti dagli altri Paesi europei (7).

Questa differenza era già nota in letteratura (46), ed è stata giustificata dalla particolare alimentazione del popolo turco con un inferiore contenuto di carne rispetto alla media europea, e in parte alla minore pratica all'esercizio fisico [dato per altro confermato dai questionari di arruolamento dei soggetti arruolati in EuBIVAS (7, 42)]. In questo particolare caso, i dati del

sottogruppo "Turchia" sono stati esclusi dalla popolazione globale per il calcolo delle stime di VB (7).

Differenze sottogruppi donne in età fertile/donne in menopausa

Per alcuni misurandi è stata invece verificata una differenza significativa tra i valori medi di concentrazione, e le stime di VB, non solo tra i sottogruppi divisi per sesso, ma anche tra femmine in età fertile e femmine in menopausa. Le donne del sottogruppo menopausa hanno concentrazioni significativamente superiori rispetto al gruppo donne in età fertile per colesterolo totale, LDL e HDL, e, per contro, presentano CV_I significativamente inferiori (45).

L'aumento di colesterolo totale e di LDL nelle donne in menopausa, è un dato noto in letteratura e ritenuto causa di aumento di rischio cardiovascolare (47-49). Ma se tale aumento, inizialmente, era stato correlato semplicemente a un aumento di peso della donna in menopausa (50, 51), lo studio prospettico di Matthew et al., riguardante più di 3000 donne di etnie diverse esaminate intorno al periodo della menopausa (52), ha dimostrato l'indipendenza dell'aumento di colesterolo da altri fattori come il peso, l'aumento di peso, l'etnia e l'assunzione di farmaci/ormoni. L'incremento della concentrazione di colesterolo è graduale a partire da qualche anno prima della menopausa, con un picco durante l'anno di transizione, per poi raggiungere nel giro di pochi anni, un plateau. Quindi, pur non essendo inaspettate, le differenze trovate tra i valori medi di colesterolo totale e lipoproteico nelle donne in età fertile e nelle donne in menopausa, hanno originato dati di VB specifici nei due sottogruppi. (45).

Comparazione tra le nuove stime di VB e le stime attualmente in uso e disponibili sul database on-line disponibile sul sito di Westgard

La maggior parte delle stime di VB intra-individuo e inter-individui ottenute sia nella prima fase di analisi di EuBIVAS che nei progetti su base nazionale Italiano e Turco per i parametri ematologici (dettagliato più sotto), sono più basse rispetto a quelle riportate nel database disponibile "on-line" (10). In Tabella 5 sono riportate le nuove stime di CV_I e di CV_G per le attività enzimatiche (43) e per la creatinina sierica (7), derivate dai dati di EuBIVAS che sono state selezionate per calcolare le APS. Nel caso di differenze significative tra sottogruppi, viene indicato il valore inferiore. Come si può vedere dalla tabella, i CV_I sono tutti inferiori di quelli riportati on-line, e conseguentemente, lo sono anche le APS derivate per l'imprecisione. I CV_G invece sono pressoché sovrapponibili a quelli attualmente in uso.

Progetti italiano e turco di VB per i parametri ematologici

Un problema a parte è rappresentato dai dati di VB per i parametri ematologici, in quanto i campioni di

Tabella 5
Stime di variabilità biologica e specifiche delle prestazioni analitiche (APS) desiderabili, derivate dai dati di EuBIVAS, confrontate con quelle riportate nel database di Ricos et al. (10)

| Riferimento bibliografico | Variabilità biologica | | | | APS desiderabili derivate dai dati EuBIVAS ^a | | | | APS desiderabili riportate nel database di Ricos et al. (10) | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|---|------|-------------------|-------------------|--|---------------|-------------------|-------|---------------|
| | EuBIVAS | | Ricos et al. (10) | | EuBIVAS ^a | | Ricos et al. (10) | | EuBIVAS ^a | | Ricos et al. (10) | | |
| | CV _I (95%CI) | CV _G (95%CI) | CV _I | CV _G | Imprecisione (CV) | Bias | Errore totale | Imprecisione (CV) | Bias | Errore totale | Imprecisione (CV) | Bias | Errore totale |
| S-Creatinina (7) | 4,4% (4,2-4,7) | 10,2% (8,4-13,0) | 6,0% | 14,7% | 2,2% | 2,8% | 6,4% | 3,0% | 4,0% | 8,9% | 3,0% | 4,0% | 8,9% |
| S-Alanina aminotransferasi (43) | 9,3% (8,7-10,0) | 25,2% (21,3-32,1) | 19,4% | 41,6% | 4,7% | 6,7% | 14,4% | 9,7% | 11,5% | 27,5% | 9,7% | 11,5% | 27,5% |
| S-αAmilasi (43) | 6,8% (6,5-7,2) | 30,4% (26,5-36,3) | 8,7% | 28,3% | 3,4% | 8,4% | 13,4% | 4,4% | 7,4% | 14,6% | 4,4% | 7,4% | 14,6% |
| S-αAmilasi isoenzima pancreatico (43) | 6,3% (6,0-6,7) | 24,9% (21,9-30,1) | 11,7% | 29,9% | 3,2% | 7,8% | 11,6% | 5,9% | 8,0% | 17,7% | 5,9% | 8,0% | 17,7% |
| S-Aspartato aminotransferasi (43) | 9,5% (9,0-10,2) | 20,3% (17,7-24,2) | 12,3% | 23,1% | 4,8% | 5,6% | 13,4% | 6,2% | 6,5% | 16,7% | 6,2% | 6,5% | 16,7% |
| S-Creatinichinasi (43) | 14,5% (13,8-15,4) | 30,5% (24,8-38,4) | 22,8% | 40,0% | 7,3% | 8,4% | 20,4% | 11,4% | 11,5% | 30,3% | 11,4% | 11,5% | 30,3% |
| S-Fosfatasi alcalina (43) | 5,3% (5,0-5,7) | 24,9% (21,4-29,3) | 6,5% | 26,1% | 2,7% | 6,4% | 10,7% | 3,2% | 6,7% | 12,0% | 3,2% | 6,7% | 12,0% |
| S-γ-Glutammiltransferasi (43) | 8,9% (8,1-9,7) | 34,2% (28,1-43,4) | 13,4% | 42,2% | 4,5% | 8,4% | 15,7% | 6,7% | 11,1% | 22,1% | 6,7% | 11,1% | 22,1% |
| S-Lattato deidrogenasi (43) | 5,2% (5,0-5,5) | 12,6% (10,8-14,7) | 8,6% | 14,7% | 2,6% | 3,4% | 7,7% | 4,3% | 4,3% | 11,4% | 4,3% | 4,3% | 11,4% |
| S-Lipasi pancreatica (43) | 7,7% (7,2-8,3) | 23,8% (20,6-28,2) | 32,2% | 31,8% | 3,9% | 6,3% | 12,6% | 16,1% | 11,3% | 37,9% | 16,1% | 11,3% | 37,9% |

APS, specifiche di prestazione analitica; EuBIVAS, "European Biological Variation Study"; CV_I, variabilità biologica intraindividuale; CI, intervallo di confidenza; CV_G, variabilità biologica inter-individuale.

^aPer il calcolo delle APS sono stati usati i seguenti criteri: imprecisione = 1/2 CV_I; bias = 0,25(CV_I² + CV_G²)^{0,5}; errore totale = 1,65 1/2 CV_I + 0,25(CV_I² + CV_G²)^{0,5}.

sangue intero non possono essere conservati né congelati e le misure devono essere effettuate lo stesso giorno della raccolta. Infatti, come indicato in [Figura 1s](#) per i campioni non stabili, il disegno sperimentale deve essere pensato e progettato *ad hoc*. Non essendo stato possibile quindi includere lo studio di questi parametri in un progetto multicentrico come EuBIVAS, è stato avviato un progetto dedicato ai parametri ematologici in un unico laboratorio italiano (Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo), e uno analogo in un laboratorio turco del WG-BV. Entrambi gli studi sono stati condotti in conformità con la lista di controllo di EFLM (17). I risultati del progetto Italiano sono stati pubblicati recentemente (53-55), i risultati del progetto turco sono in corso di pubblicazione. Attraverso lo studio italiano, oltre che aggiornare le stime di VB attualmente in uso, è stato anche possibile calcolare dati di VB per nuovi parametri ematologici, per i quali non esisteva ancora alcun dato in letteratura. Infatti, gli analizzatori ematologici a flusso di ultima generazione offrono, oltre ai parametri tradizionali, un ampio spettro di nuovi parametri, come ad esempio il conteggio dei granulociti immaturi, i parametri morfo-funzionali leucocitari, il contenuto medio di emoglobina nei reticolociti, la frazione immatura delle piastrine. Questi parametri forniscono informazioni utili per la diagnosi e il monitoraggio di pazienti con sepsi, anemie, piastrinopenie e altre patologie ematologiche e non (53-55).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la dott.ssa Sabrina Buoro per la preziosa supervisione alla stesura del manoscritto.

Si ringraziano tutti i componenti del WG-BV e della TFG-BVD di EFLM coinvolti nel progetto EuBIVAS e BIVAC.

Un ringraziamento particolare infine ai volontari che hanno donato il sangue nel progetto europeo EuBIVAS, e nei progetti per i parametri ematologici italiano e turco.

BIBLIOGRAFIA

- Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: an update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53:313-25.
- Fraser CG. The nature of biological variation. In: *Biological variation: from principles to practice*. Washington: AACC Press, 2001;1-27.
- Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999;45:321-3.
- Fraser CG. Reference change values: the way forward in monitoring. *Ann Clin Biochem* 2009;46:264-5.
- Costongs GM, Janson PC, Bas BM, et al. Short-term and long-term intraindividual variations and critical differences of clinical chemistry laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:7-16.
- Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. 3. Physiological and medical implications. *Clin Chem* 1970;16:1028-32.
- Carobene A, Marino I, Coskun A, et al. The EuBIVAS project: Within- and between-subject biological variation data for serum creatinine using enzymatic and alkaline picrate methods and implications for monitoring. *Clin Chem* 2017;63:1527-36.
- Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, et al. The biological variation data critical appraisal checklist (BIVAC): a proposed standard for valuating studies on biological variation. *Clin Chem* 2017; DOI: 10.1373/clinchem.2017.281808
- Fraser CG, Browning MC. The "index of fiduciality" proposed for use in evaluation and comparison of methods. *Clin Chem* 1988;34:1356-7.
- Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Desirable specification for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter- individual biologic variation. The 2014 update. Available from: www.westgard.com/biodatabase1.htm. (ultimo accesso: Settembre, 2017)
- Perich C, Minchinela J, Ricos C, et al. Biological variation database: structure and criteria used for generation and update. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:299-305.
- Fraser CG, Kallner A, Kenny D, et al. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:475-585.
- Sandberg S, Fraser FG, Horvath AR, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:833-5.
- Cerioti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, et al. Criteria for assigning measurands to models for analytical performance specifications. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55:189-94.
- Panteghini M, Sandberg S. Defining analytical performance specifications 15 years after the Stockholm conference. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:829-32.
- Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27:409-37.
- Bartlett WA, Braga F, Carobene A, et al. A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:879-85.
- Fraser CG. Biological variation in clinical chemistry. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:916-23.
- Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
- Carobene A. Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:871-7.
- Carobene A, Braga F, Roraas T, et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and g-glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1997-2007.
- Braga F, Dolci A, Mosca A, et al. Biological variability of glycated hemoglobin. *Clin Chim Acta* 2010;411:1606-10.
- Braga F, Panteghini M. Biological variability of C-reactive protein: is the available information reliable? *Clin Chim Acta* 2012;413:1179-83.
- <https://www.eflm.eu/> (ultimo accesso: Dicembre 2017)
- Panteghini M, Cerioti 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.

26. <https://www.eflm.eu/site/page/a/1084> (ultimo accesso: Dicembre 2017)
27. <http://www.seqc.es/> (ultimo accesso: Settembre 2017)
28. <https://www.eflm.eu/site/page/a/1148> (ultimo accesso: Dicembre 2017)
29. Pagani F, Panteghini M. Biological variation in serum activities of three hepatic enzymes. *Clin Chem* 2001;47:355-6.
30. Bailey D, Bevilacqua V, Colantonio DA, et al. Pediatric within-day biological variation and quality specifications for 38 biochemical markers in the caliper cohort. *Clin Chem* 2014;60:518-29.
31. Statland BE, Winkel P, Bokelund H. Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents. 1. Within-day variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 1973;19:1374-9.
32. Qi Z, Chen Y, Zhang L, Ma X, et al. Biological variations of thirteen plasma biochemical indicators. *Clin Chim Acta* 2016;452:87-91.
33. Winkel P, Statland BE, Bokelund H. Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 5. Short-term day-to-day and within-hour variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 1974;20:1520-7.
34. Hölzel WG. Intra-individual variation of analytes in serum from patients with chronic liver diseases. *Clin Chem* 1987;33:1133-6.
35. Hölzel WG. Intra-individual variation of some analytes in serum of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Chem* 1987;33:57-61.
36. Pineda-Tenor D, Laserna-Mendieta EJ, Timon-Zapata J, et al. Biological variation and reference change values of common clinical chemistry and haematologic laboratory analytes in the elderly population. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:851-62.
37. <http://biologicalvariation.eu/> (ultimo accesso: Dicembre 2017)
38. Fraser CG. Biological variation: a rapidly evolving aspect of laboratory medicine. *J Lab Precis Med* 2017;2:35.
39. Carobene A; on behalf of the EFLM Working Group on Biological Variation. The European Biological Variation Study (EuBIVAS): delivery of updated biological variation estimates, a project by the Working Group on Biological Variation in the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *J Lab Precis Med* 2017;2:70.
40. Røraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem* 2012;58:1306-13.
41. Carobene A, Graziani MS, Lo Cascio C, et al. Age dependence of within-subject biological variation of nine common clinical chemistry analytes. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:841-4.
42. Carobene A, Strollo M, Jonker N, et al. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the working group on biological variation established by the European federation of clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1599-608.
43. Carobene A, Røraas T, Sølviq UØ, et al. Biological variation estimates obtained from 91 healthy study participants for 9 enzymes in serum. *Clin Chem* 2017;63:1141-50.
44. Carobene A, Marino I, Guerra E, et al. Biological variation estimates obtained from 91 healthy subjects for 6 electrolytes in serum. EBIOVAR study of the EFLM working-group on biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(S1):S1061. DOI 10.1515/cclm-2017-5002.
45. Marino I, Carobene A, Guerra E, et al. Within- and between-subject biological variation data obtained from 91 healthy subjects for total cholesterol, HDL, LDL-cholesterol and triglycerides in serum samples. *Biochim Clin* 2016;40, Special Suppl: S157.
46. Ozarda Y, Ichihara K, Aslan D, et al. A multicenter nationwide reference intervals study for common biochemical analytes in Turkey using Abbott analyzers. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1823-33.
47. Colditz GA, Willet WC, Stampfer MJ, et al. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987;316:1105-10.
48. Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, et al. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 1989;321:641-6.
49. Tunstall-Pedoe H. Myth and paradox of coronary risk and the menopause. *Lancet* 1998;351:1425-7.
50. Lindquist O. Intraindividual changes of blood pressure, serum lipids and body weight in relation to menstrual status: results from a prospective population study of women in Goteborg, Sweden. *Prev Med* 1982;11:162-72.
51. Guthrie JF, Dennerstein L, Dudley EC. Weight gain and the menopause: a 5-year longitudinal study. *Climacteric* 1999;2:205-11.
52. Matthews KA, Crawford SL, Chae CU, et al. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? *JACC* 2009;54:2366-73.
53. Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, et al. Biological variation of platelet parameters determined by the Sysmex XN hematology analyzer. *Clin Chim Acta* 2017;470:125-32.
54. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of leukocytes extended to differential count and morphology-structural parameters (cell population data) in blood samples obtained from healthy people. *Clin Chim Acta* 2017;473:147-56.
55. Buoro S, Carobene A, Seghezzi M, et al. Short- and medium-term biological variation estimates of red blood cell and reticulocyte parameters in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2018; doi: 10.1515/cclm-2017-0902.

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

Nunzia Iaccarino¹, Jussara Amato¹, Bruno Pagano¹, Alessia Pagano¹, Laura D'Oriano², Sveva Pelliccia¹, Mariateresa Giustiniano¹, Diego Brancaccio¹, Francesco Merlino¹, Ettore Novellino¹, Carlo Alviggi², Antonio Randazzo¹

¹Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Naples, Italy

²Department of Neuroscience, Reproductive Medicine, Odontostomatology, University of Naples Federico II, Naples, Italy

ABSTRACT

Among reproductive-age women, polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder often associated with infertility and insulin resistance. Metabolomics studies on follicular fluid (FF) have shown to provide information about changes in the physiological state of patients as well as biomarkers for oocyte quality. In this context, we performed an exploratory NMR-based metabolomic study on FF samples provided from PCOS women that were undergoing an *in vitro* fertilization (IVF) therapy. We found that the hyperinsulinemia in PCOS patients is responsible for a different FF metabolic profile. In particular, hyperinsulinemia seems to be associated with impaired carbohydrate/glucose metabolism. Interestingly, plasma concentrations of Anti-Müllerian hormone (AMH) turned out to be positively correlated with glucose and negatively correlated with lactate, pyruvate and alanine. To the best of our knowledge, this is the first study that attempts to correlate AMH values with the FF metabolites. Although the data reported here are preliminary, this study paves the way to a better comprehension of the relationships among hormones and metabolites in FF.

INTRODUCTION

Follicular fluid (FF) and cumulus cells (CC) have shown to play a key role in the oocyte health during its maturation. A highly coordinated network of interactions between the oocyte and somatic cells influences the intrafollicular microenvironment allowing the folliculogenesis (1).

FF, also known as *liquor folliculi*, has been described for the first time in 1974 as an exudate from plasma enriched with secretions from the follicles (2). Thus, its composition varies when the plasma is altered by the presence of different diseases, and/or changes in the secretory processes of the granulosa and theca cells occur, reflecting the physiological state of the follicle. The variations in FF composition are strictly connected with both the maturation (3) and quality of the oocyte (4). Indeed, Spitzer et al. observed that FF from immature follicles is characterized by a different protein pattern compared to the fluid collected from mature follicles, suggesting the potential use of selected proteins as biomarkers for follicular maturity (3). The importance of finding biochemical markers for the oocyte quality was

investigated by Revelli et al. (4). They analysed the correlations reported in the literature between the embryo characteristics and several molecular markers in FF, as hormones, growth factors, reactive oxygen species, anti-apoptotic factors, proteins, sugars and prostanoids. However, they were not able to identify substances as reliable markers for assessing the oocyte quality, most probably due to univariate scientific approach used. In fact, the same authors suggested to employ a metabolomic approach (based on a multivariate data analysis) that could be more suitable to analyse complex biological mixtures such as FF.

Metabolomics has been widely employed to analyse several biological fluid using both Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and mass spectrometry. Compared to the latter, NMR has the advantage of being highly reproducible, requiring minimal sample handling and allowing the identification of a wide range of low-molecular-weight compounds. Pinero-Sagredo et al. were the first to perform a NMR study on FF, identifying the presence of at least 42 metabolites (5). Significant correlations among glucose, β -hydroxybutyrate (3-HB), lactate, pyruvate, acetoacetate and acetate were found,

Corrispondenza a: Antonio Randazzo, Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Via D. Montesano 49, 80131 Naples, Italy. Tel. +39081678514, fax +39081678514, e-mail antonio.randazzo@unina.it

Ricevuto: 07.04.2017

Revisionato: 13.07.2017

Accettato: 17.07.2017

Pubblicato on-line: 30.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.008

thus suggesting the presence of an important anaerobic metabolism in overstimulated follicles. In addition, a statistically significant correlation was also observed between the glycolytic pathway and fatty acid metabolism in both young donors and the group with the higher fertilization rate. This study paved the way to the use of NMR-based metabolomics on FF for the discovery of biomarkers for the oocyte developmental competence (6, 7).

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) represents the most commonly occurring metabolic and endocrinological disorder affecting 5-20% of women in their reproductive age worldwide (8, 9). It is characterized by hyperandrogenism, ovulatory dysfunction and polycystic ovarian morphologic features. Being a syndrome, PCOS, is heterogeneous and also associated with multiple alterations such as repeated and quick gonadotropin-releasing hormone pulses, an excess of luteinizing hormone (LH), and insufficient follicle-stimulating hormone (FSH) secretion, which contributes to an excessive ovarian androgen production and ovulatory dysfunction. Furthermore, evidences of insulin resistance are common among women with PCOS and, as a consequence, a compensatory hyperinsulinemia promotes adrenal and ovarian androgen production, thus contributing to the hyperandrogenism (10).

One of the main features of PCOS is the increased number of antral follicles. In this frame, the growing interest in Anti-Müllerian Hormone (AMH) as follicular reserve serum marker has prompted many researchers to investigate the expression of this molecule in women with PCOS, in order to obtain information about the pathogenesis and the ability to calibrate the treatments in the case of ovulation induction or multiple follicular growth for medically assisted procreation cycles.

In order to understand the correlations among the FF composition, the hormone values and the hyper- and normoinsulinemic conditions of PCOS women, we performed an exploratory NMR-based metabolomic study on 41 samples of FF provided from women that were undergoing an IVF therapy.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

The women included in the study, ranging from 23 to 38 years old, were diagnosed with PCOS (in both ovaries) according to the Rotterdam criteria (11, 12). All women were characterized by the following parameters: number of follicles ($n > 12$), diameter of follicles (2-9 mm) and/or ovarian volume ($V > 0.10 \text{ cm}^3$). The selected donors showed no genetic anomalies, and no chronic or inflammatory diseases. Moreover, they never had ovarian surgery and were not under hormonal therapy during the 6 months prior to the study.

The patients were divided in two subgroups according to specific features that were considered valid to determine a hyper- or normoinsulinemic condition. In

particular, three parameters were considered to assess the hyperinsulinemic state: the body mass index (BMI $> 27 \text{ kg/m}^2$), the waist to hip ratio (WHR > 0.85) and the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR > 2.5). Only patients with positivity to all three parameters were considered belonging to the group of hyperinsulinemic women. Conversely, the patients showing a HOMA-IR < 2.5 , WHR < 0.85 and BMI $< 27 \text{ kg/m}^2$ were assigned to the normoinsulinemic group. For each patient, a pelvic ultrasound with vaginal probe (6.5 MHz) was then performed.

All the individuals involved in the study were undergoing to a GnRH antagonist type therapy for the induction of multiple follicular growth as well as stimulation with recombinant FSH (rFSH). In addition, a folic acid-based treatment and inositol therapy were employed for 5 months. For the final oocyte maturation, 10,000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) were administered, in order to stimulate the ovulation.

Sample collection

FF samples from 41 women were provided by the "IVF Center, Department of Neuroscience, Reproductive Science and Odontostomatology", Federico II University Hospital in Naples. All the patients provided informed consent for the use of the residual samples anonymously. Samples were collected by means of transvaginal ultrasound-guided puncture. The fluid was then separated from the oocytes, and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis, as detailed in a previous study (13).

Serum analysis

In order to assess the insulin resistance (IR) among the patients, an HOMA-IR was performed as described by Matthews et al. (14). Furthermore, the serum concentration of AMH was also measured, being a key factor in the PCOS pathology. The complete serum analysis and the characteristics of the studied population are reported in Table 1.

NMR spectroscopy

FF samples were thawed at room temperature and then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. NMR samples were prepared mixing 175 μL of the supernatant with 35 μL of deuterium oxide (D_2O) and 140 μL of phosphate buffer in order to obtain a pH value of 7.4. The samples were then transferred to 3 mm NMR tubes for the analysis. The spectra were recorded at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ with a 700 MHz Varian Unity Inova spectrometer equipped with a 5 mm $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ triple resonance probe.

A Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence was employed in this study in order to reduce the broad resonances from high-molecular-weight compounds, allowing the observation of low-molecular-weight metabolites. A total of 128 scans and 16K data points were used to perform each measurement. The spectra were then processed using iNMR (www.inmr.net). An exponential line broadening of 0.5 Hz

Table 1*Clinical and laboratory parameters: values and statistical evaluation of the data distribution*

| | | No. | Mean | SEM | Median | SD | Skewness | SE _{Skewness} | Z _{Skewness} | Kurtosis | SE _{Kurtosis} | Z _{Kurtosis} | Shapiro-Wilk Test | |
|--------------------------|-------|-----|--------|-------|--------|-------|----------|------------------------|-----------------------|----------|------------------------|-----------------------|-------------------|---------|
| | | | | | | | | | | | | | Statistic | P value |
| Age (years) | Hyper | 12 | 31.4 | 0.9 | 31.5 | 3.0 | 0.46 | 0.64 | 0.73 | 1.35 | 1.23 | 1.09 | 0.96 | 0.836 |
| | Normo | 29 | 31.2 | 0.6 | 32.0 | 2.8 | 0.04 | 0.46 | 0.09 | -0.56 | 0.90 | -0.62 | 0.98 | 0.832 |
| BMI (Kg/m ²) | Hyper | 12 | 31.4 | 0.8 | 30.5 | 2.7 | 0.61 | 0.64 | 0.96 | -0.54 | 1.23 | -0.44 | 0.93 | 0.402 |
| | Normo | 29 | 22.7 | 0.5 | 23.0 | 2.4 | -0.13 | 0.46 | -0.27 | -0.62 | 0.90 | -0.69 | 0.98 | 0.877 |
| HOMA | Hyper | 12 | 3.4 | 0.2 | 3.4 | 0.7 | 1.33 | 0.64 | 2.09 | 2.56 | 1.23 | 2.07 | 0.89 | 0.118 |
| | Normo | 29 | 1.4 | 0.1 | 1.3 | 0.7 | 0.25 | 0.46 | 0.53 | -1.19 | 0.90 | -1.32 | 0.94 | 0.152 |
| No. of follicles | Hyper | 12 | 8.4 | 1.0 | 8.0 | 3.6 | 0.28 | 0.64 | 0.44 | -1.01 | 1.23 | -0.82 | 0.94 | 0.489 |
| | Normo | 29 | 10.8 | 0.7 | 10.0 | 3.6 | 0.28 | 0.46 | 0.60 | -0.64 | 0.90 | -0.71 | 0.96 | 0.456 |
| No. of MII oocytes | Hyper | 12 | 7.4 | 1.1 | 6.5 | 3.8 | 0.27 | 0.64 | 0.42 | -1.70 | 1.23 | -1.38 | 0.89 | 0.104 |
| | Normo | 29 | 8.8 | 0.7 | 9.0 | 3.6 | 0.45 | 0.46 | 0.97 | -0.20 | 0.90 | -0.22 | 0.96 | 0.498 |
| FSH (IU/L) | Hyper | 12 | 5.7 | 0.4 | 5.4 | 1.4 | 0.66 | 0.64 | 1.04 | -0.50 | 1.23 | -0.40 | 0.93 | 0.423 |
| | Normo | 29 | 5.5 | 0.4 | 5.2 | 1.8 | -0.19 | 0.46 | -0.42 | -0.17 | 0.90 | -0.19 | 0.97 | 0.710 |
| LH (IU/L) | Hyper | 12 | 5.9 | 0.8 | 5.5 | 2.6 | 1.36 | 0.64 | 2.14 | 1.90 | 1.23 | 1.54 | 0.88 | 0.101 |
| | Normo | 29 | 6.6 | 0.8 | 6.4 | 4.0 | 2.07 | 0.46 | 4.47 | 5.55 | 0.90 | 6.15 | 0.78 | 0.000 |
| AMH (IU/L) | Hyper | 12 | 2.9 | 0.4 | 3.1 | 1.3 | -0.25 | 0.64 | -0.40 | 0.23 | 1.23 | 0.19 | 0.98 | 0.990 |
| | Normo | 29 | 6.0 | 0.8 | 5.2 | 4.1 | 2.34 | 0.46 | 5.05 | 7.60 | 0.90 | 8.42 | 0.78 | 0.000 |
| Total dose of Gn (IU/L) | Hyper | 12 | 1657.5 | 204.1 | 1650.0 | 707.1 | 0.19 | 0.64 | 0.29 | -0.35 | 1.23 | -0.29 | 0.92 | 0.298 |
| | Normo | 29 | 1069.6 | 70.2 | 1100.0 | 351.0 | -0.25 | 0.46 | -0.54 | -0.79 | 0.90 | -0.87 | 0.97 | 0.558 |
| Days of Gn stimulation | Hyper | 12 | 11.2 | 0.7 | 12 | 2.4 | -0.61 | 0.64 | -0.96 | -0.94 | 1.23 | -0.76 | 0.90 | 0.158 |
| | Normo | 29 | 9.7 | 0.4 | 10 | 2.1 | -0.19 | 0.46 | -0.41 | -0.56 | 0.90 | -0.62 | 0.95 | 0.263 |
| E2 on day 5 | Hyper | 12 | 173.4 | 51.7 | 94.5 | 179.1 | 1.94 | 0.64 | 3.05 | 4.07 | 1.23 | 3.30 | 0.74 | 0.002 |
| | Normo | 29 | 447.2 | 62.8 | 349.0 | 313.8 | 0.55 | 0.46 | 1.18 | -0.91 | 0.90 | -1.00 | 0.89 | 0.014 |
| E2 peak | Hyper | 12 | 1363.7 | 189.9 | 1135.5 | 657.8 | 1.16 | 0.64 | 1.82 | 0.05 | 1.23 | 0.04 | 0.81 | 0.011 |
| | Normo | 29 | 1473.8 | 120.8 | 1535.0 | 603.8 | 0.28 | 0.46 | 0.60 | -0.15 | 0.90 | -0.16 | 0.96 | 0.346 |

AMH, Anti-Müllerian hormone; BMI, body mass index; Df, degree of freedom; E2, estradiol; FSH, follicle stimulating hormone; Gn, gonadotropins; HOMA, homeostatic model assessment for insulin resistance; LH, luteinizing hormone; MII, metaphase II; SD, standard deviation; SEM, standard error of mean.

Grey cells indicate the clinical parameters showing a non-normal distribution.

was applied to the free-induction decay prior to Fourier transformation.

All acquired NMR spectra were phase- and baseline-corrected, then referenced to the singlet at 1.91 ppm (acetate). Spectral ¹H assignments were made based on both the literature values (5) and the library provided by the Chenomx database (Chenomx NMR Suite 8.1, Chenomx Inc., Canada).

Data processing and multivariate data analysis

NMR spectra were then imported into MATLAB (R2012b; Mathworks, Natick, MA) where the spectral regions above 9 ppm and below 0 ppm were removed

because they contained only noise. Furthermore, the region between 4.16 and 5.20 ppm was discarded because it was dominated by the residual water signal. In order to correct for spectral misalignment, the entire dataset was globally aligned respect to the acetate signal (1.91 ppm) using the icoshift algorithm (15).

The data matrix was then submitted to the PLS toolbox version 8.1.1 (Eigenvector Research, Manson, USA) where the total area normalisation (1-norm) was performed prior to the pareto-scaling and mean-centering in order to compute the Principal Components Analysis (PCA).

PCA is an unsupervised pattern recognition method

that allows the reduction of the dimensionality of a data set consisting of a large number of interrelated variables, providing a visual representation of the major variance in the data (16). Thus, the original variables are transformed into a smaller set of new uncorrelated variables, called principal components (PCs), which are ordered according to the explained variance that they are able to retain. Most of the relevant systematic information is usually calculated by the first few PCs, while the following ones are often computed considering chance variation and noise. The outcome of this analysis consists of two plots: a scores plot, where the samples are displayed as scores, and a loadings plot that shows the variables.

The scores are the projection of the data onto the new coordinate system defined by the PCs, whereas the loadings define the size of the contribution of each original variable to the component.

Thus, samples having similar scores will cluster together as well as variables with comparable loadings will be close, meaning that they are highly correlated.

The multivariate analysis described above have been used to study the NMR spectra of the sampled FFs. The NMR dataset was taken into consideration using both the entire set of variables and, in order to reduce model complexity, using only the NMR relative quantification of 14 selected metabolites. In particular, the peak areas of the well-separated resonances were manually integrated and submitted to the data analysis.

Finally, a metabolite-metabolite correlation analysis was conducted on all sampled FFs using the selected integrated NMR peaks. In particular, the Spearman's rank correlation coefficient, indicated as r_s , was calculated. This parameter can range from -1 for a perfect negative linear relationship to $+1$ for a perfect positive linear relationship. A value around 0 indicates no

relationship between two variables. Furthermore, to assess the statistical significance of a correlation, the p-value calculation was also performed.

Statistical analysis

Data distribution, both of the clinical parameters and the NMR-integrated metabolites, was assessed by using the Shapiro-Wilk's test and a visual inspection of their histograms, normal Q-Q plots and box plots. All data were analysed using SPSS version 24.0 and the 5% significance level.

RESULTS AND DISCUSSIONS

A total of 41 FF samples were analysed by ^1H NMR spectroscopy. A representative spectrum of FF sample is shown in Figure 1. The FFs were characterized by low-molecular-weight metabolites including amino acids (valine, alanine, glycine, phenylalanine and tyrosine), organic acids (lactate, acetate, acetoacetate, pyruvate and formate) and glucose.

An exploratory PCA was first performed on the data set consisting of the complete NMR spectra. The PCA scores plot (PC1/PC2, 48.8% of total variance explained) showed a slight separation of the samples according to the hyper/normo-insulinemic condition of the PCOS patients along the diagonal direction of the plot (data not shown). Unfortunately, the loading plot of PC1 (26.9% of the explained variance) is actually dominated by signals that cannot be assigned to traditional metabolites (except glycine), suggesting that they may be attributed to contaminant(s) that could affect the interpretation of the PCA. In order to analyse a PCA built by most reliable variables, all the peaks of the proton NMR spectrum that could be unambiguously

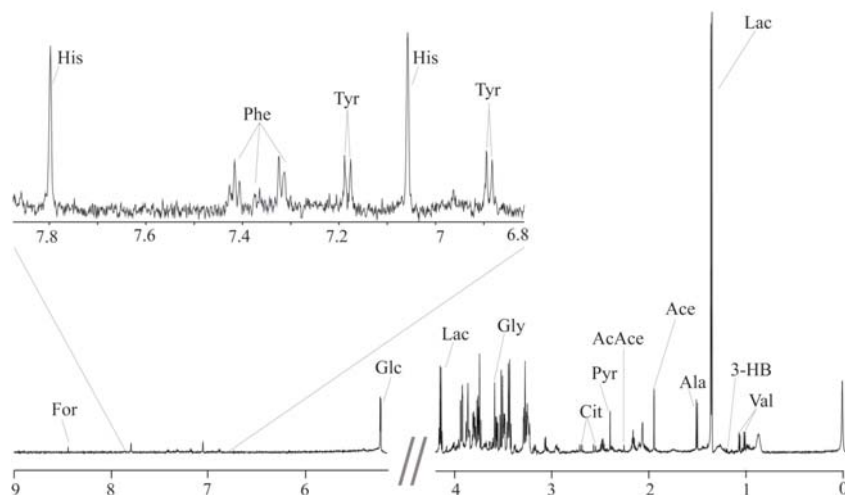


Figure 1

^1H CPMG NMR spectrum of a representative follicular fluid sample measured at 700 MHz and 25 °C.

3-HB, 3-hydroxybutyrate; AcAce, acetoacetate; Ace, acetate; Ala, alanine; Cit, citrate; For, formate; Glc, glucose; Gly, glycine; His, histidine; Lac, lactate; Phe, phenylalanine; Pyr, pyruvate; Tyr, tyrosine; Val, valine.

assigned to known metabolites have been taken into consideration, and therefore integrated. Thus, 14 integral values were used to build a new data matrix, that has been augmented by additional 12 clinical variables from the biochemical measurements (see paragraph *Serum analysis* in *Materials and Methods* section). This approach has the advantage to compare altogether a larger number of information, thus providing a more complete picture of the physiological condition of the studied population. So, a new PCA has been computed and it is reported in Figure 2. As shown in the score plot, a better separation occurs between the hyperinsulinemic and normoinsulinemic PCOS women. The variables that better explain this separation are those having larger loading values along the direction of the sample separation (see the loadings plot in Figure 2). Therefore, the normoinsulinemic group is characterized by high concentrations of glucose and AMH, while hyperinsulinemic women present higher concentration of lactate, alanine and pyruvate. From a metabolic point of view, glucose, lactate and pyruvate are strictly correlated to each other, being all metabolites of the glycolytic pathway. Interestingly, in normal physiological conditions, the follicles grow in an anaerobic environment since the avascular granulosa layer (that surround them) increases its thickness, thus preventing the oxygen supply in the follicle (17). In particular, granulosa cells (GC) and CC are required to provide products of glycolysis for the development of the oocyte, which is unable to carry out this pathway (18). In these conditions, the pyruvate transformation into lactate is obtained due to the limited amounts of oxygen available. Pyruvate is the final key 3-carbon (3-C) intermediate transferred to the oocyte, however it is interchangeable with lactate which is the main 3-C compound produced by the GC.

Likewise, alanine is linked to glycolysis pathway. In fact, alanine can be also produced by reductive

amination of pyruvate. The increase of alanine concentration in the insulin-resistant PCOS women (compared to non-insulin resistant patients) is in perfect agreement with a previous study reported by Zhang et al. (19).

As mentioned above, among the variables that mostly contributed to the separation of the normoinsulinemic and hyperinsulinemic women there is also the Anti-Müllerian hormone (AMH). This hormone is a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily and it is considered an important marker of ovarian reserve (20). AMH plasma values are important markers for PCOS. Actually, women affected by the syndrome, have 2- to 3-fold higher levels of AMH than healthy women (21). Interestingly, Takahashi et al. found that oocytes are more likely to be fertilized when follicles are able to produce high concentrations of AMH in the follicular fluid. Thus, they speculated that AMH could be considered a prediction marker for fertilization (22). Lin et al. found also a negative correlation between AMH and BMI. This could be in line with our result, as normoinsulinemic women have a lower BMI than the insulin-resistant group. However, the authors didn't find any correlation between the hormone values and the insulin resistance parameters (23).

The study of the correlations among all the metabolites has been demonstrated to be a valuable analytical tool in systems biology (24). In particular, the Spearman's rank correlation coefficient was calculated since the relative concentration of some metabolites showed a non-normal distribution (25). At a threshold of $|rs| \geq 0.5$, 20 positive and 6 negative significant correlations were found, and the metabolites characterized by the highest correlation values turned out to be glucose, lactate, pyruvate, acetoacetate and 3-HB. We have found significant ($p < 0.05$) negative correlations between glucose and lactate (-0.72), and between glucose and pyruvate (-0.50). On the contrary,

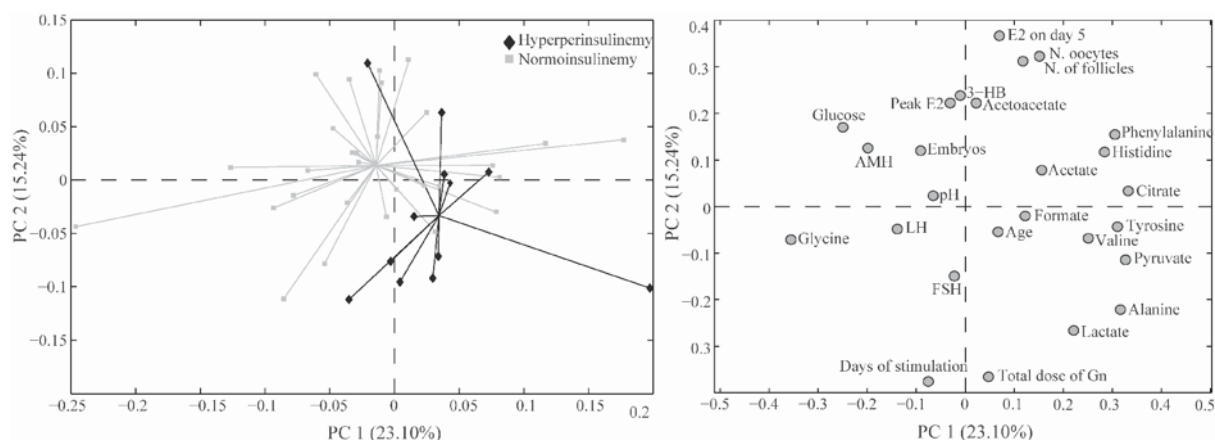


Figure 2

PCA scores (left) and corresponding loadings plot (right) derived from the data analysis of the integrated peaks of the ^1H NMR spectra of follicular fluids together with the clinical and biochemical parameters measured among the PCOS women. 3-HB, 3-hydroxybutyrate; AMH, Anti-Müllerian hormone; E2, estradiol; Gn, gonadotropins; LH, luteinizing hormone.

we found significant positive correlations between pyruvate and lactate (0.57), and between acetoacetate and 3-HB (0.90). Interestingly, these data are in agreement with the metabolite correlations found in FF of women not presenting the PCOS (5). These correlations strengthen the hypothesis of an important anaerobic metabolism occurring in the hyperstimulated follicles (17); the strong correlations among glucose, pyruvate and lactate confirm that FF provides lactate and pyruvate to the developing oocyte as a source of energy. Acetoacetate and 3-HB are synthesised from acetyl-CoA by fatty acid oxidation and their correlation can be explained by the fact that they are interconvertible by means of the β -hydroxybutyrate dehydrogenase.

In summary, FF represents a suitable source of information since it is superfluous, abundant and easily available material during the IVF treatment. Metabolomics studies on this fluid can provide useful information about changes in the physiological state of patients, alterations of metabolic pathways, as well as biomarkers for oocyte quality and IVF success rate. In the case reported here, the hyperinsulinemia in PCOS patients is responsible for a different FF metabolic profile. In particular, hyperinsulinemia seems to be associated with impaired carbohydrate/glucose metabolism. Interestingly, AMH turned out to be positively correlated with glucose and negatively correlated with lactate, pyruvate and alanine. Although the data reported here are preliminary, this study paves the way to a better comprehension of the relationships among hormones and metabolites. To the best of our knowledge, this is the first study that attempts to correlate AMH values with the FF metabolites.

CONFLICTS OF INTERESTS

None.

REFERENCES

- Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, et al. Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015;103:303–16.
- Edwards RG. Follicular Fluid. *J Reprod Fertil* 1974;37:189–219.
- Spitzer D, Murach KF, Lottspeich F, et al. Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Hum Reprod* 1996;11:798–807.
- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, et al. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:40.
- Pinero-Sagredo E, Nunes S, de Los Santos MJ, et al. NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR Biomed* 2010;23:485–95.
- O'Gorman A, Wallace M, Cottell E, et al. Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence. *Reproduction* 2013;146:389–95.
- Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, et al. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil Steril* 2012;97:1078–84.
- Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:219–31.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91:456–88.
- McCartney CR, Marshall JC. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2016;375:54–64.
- Azziz R. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: The Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:781–5.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Position statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237–45.
- Alvigi C, Cariati F, Conforti A, et al. The effect of FT500 Plus® on ovarian stimulation in PCOS women. *Reprod Toxicol* 2016;59:40–4.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- Savorani F, Tomasi G, Engelsen SB. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J Magn Reson* 2010;202:190–202.
- Hottelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ Psychol* 1933;24:417–441.
- Gull I, Geva E, Lerner-Geva L, et al. Anaerobic glycolysis: The metabolism of the preovulatory human oocyte. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;85:225–8.
- Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Dev Biol* 2005;279:20–30.
- Zhang C-M, Zhao Y, Li R, et al. Metabolic heterogeneity of follicular amino acids in polycystic ovary syndrome is affected by obesity and related to pregnancy outcome. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014;14:11.
- Van Rooij IAJ. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:3065–71.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, et al. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5957–62.
- Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, et al. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;89:586–91.
- Lin Y-H, Chiu W-C, Wu C-H, et al. Antimüllerian hormone and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011;96:230–5.
- Steuer R. Review: on the analysis and interpretation of correlations in metabolomic data. *Brief Bioinform* 2006;7:151–8.
- Bolboaca S-D, Jäntschi L. Pearson versus Spearman, Kendall's tau correlation analysis on structure-activity relationships of biologic active compounds. *Leonardo J Sci* 2006;5:179–200.

Valutazione del sistema Optilite™ per la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero

Ilenia Infusino^{1,2}, Simona Borille¹, Mauro Panteghini^{1,2}

¹UOC Patologia Clinica, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano

²Centro di Ricerca per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Evaluation of the Optilite™ system for the determination of immunoglobulin free light chains in serum (sFLC). The measurement of sFLC κ and λ and κ/λ ratio calculation is recommended for evaluation and management of plasma cell disorders. However, some analytical issues persist in their measurements, among which a too large long-term imprecision seems to be the main challenge. We evaluated the new Optilite system (The Binding Site) for sFLC determination by comparing its performance with specifications for bias, imprecision (as CV) and total error derived from biological variation of sFLC. We collected data during one year of routine use by employing three reagent lots. The system alignment was checked using the two-level (L and H) Optilite control material by comparing the obtained long-term experimental mean (n=233, both levels) with the manufacturer's assigned values. The protocol for CV evaluation employed the liquid-frozen BioRad Liquichek Control and a frozen serum pool tested for 125 and 79 runs, respectively. Inaccuracy was evaluated by results of four UK-NEQAS exercises [system-specific (Optilite) consensus value as reference]. Average cumulative bias [1.1% (L) and -2.0% (H) for sFLC κ ; 5.4% (L) and 0.1% (H) for sFLC λ , respectively] fulfilled the desirable goals. CVs for sFLC κ (7.1% for Liquichek and 6.6% for the pool, respectively), sFLC λ (7.8% for both Liquichek and the pool) and κ/λ ratio (8.9% for Liquichek and 10.2% for the pool, respectively) failed however to reach minimum quality goals. In EQAS evaluation, all sFLC κ and λ and 3 out of 4 κ/λ ratio results were within the allowable total error. In our experience, the Optilite system shows a good method alignment suitable for sFLC interpretation using fixed cut-offs. However, the assay reproducibility is probably not suitable for optimal long-term monitoring of individual patients.

INTRODUZIONE

La determinazione delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero (sFLC) ha assunto un ruolo importante nella gestione del mieloma multiplo e di altre discrasie plasmacellulari, quali amiloidosi AL e delle malattie da deposizione di catene leggere, associando alla presenza di un'alterazione del rapporto κ/λ quella di un clone proliferativo di plasmacellule (1). L'International Myeloma Working Group (IMWG) ha recentemente aggiornato le proprie linee guida includendo tra i criteri per la diagnosi del mieloma multiplo come marcatore di malignità, un rapporto tra la catena leggera coinvolta e quella non coinvolta ≥ 100 , purché la sFLC monoclonale coinvolta abbia una concentrazione ≥ 100 mg/L e sia

misurata utilizzando il kit Freelite (The Binding Site) (2). L'indicazione del metodo si è resa necessaria perché, in mancanza di un sistema internazionale di riferimento, le evidenze cliniche costruite mediante l'impiego del metodo Freelite non sono automaticamente trasferibili a metodi diversi, comparsi successivamente sul mercato (3, 4). La conseguenza clinica della mancanza di standardizzazione della misura delle sFLC è quindi il rischio che un paziente soddisfi o meno i criteri di diagnosi di mieloma in base al metodo di misura utilizzato dal laboratorio, annullando il vantaggio che questa determinazione dovrebbe fornire nella individuazione precoce dei pazienti a elevato rischio di sviluppare rapidamente un danno d'organo (5).

Al problema della non comparabilità intermetodo,

**Questo lavoro è stato in parte presentato come poster al 22th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 11-15 giugno 2017, Atene (Grecia).*

Corrispondenza a: Ilenia Infusino, UOC Patologia Clinica, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Via GB Grassi 74, 20157 Milano. Tel. 0239042745, fax 0250319835, e-mail infusino.ilenia@asst-fbf-sacco.it

Ricevuto: 28.08.2017

Revisionato: 14.09.2017

Accettato: 25.09.2017

Pubblicato on-line: 15.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.001

ultimamente da più parti sperimentalmente segnalata (6-9), si associa la necessità di una riproducibilità dei singoli metodi, che consenta di predire accuratamente una progressione della malattia valutando oggettivamente i cambiamenti nei valori di sFLC ottenuti dall'analisi di campioni seriali dello stesso paziente mediante l'applicazione del concetto di differenza critica (10, 11). Si comprendono quindi gli sforzi continui rivolti alla ricerca di un sistema analitico che soddisfi i traguardi analitici di imprecisione per l'applicazione clinica della misura delle sFLC, sia da parte degli utilizzatori (12, 13) che da parte dei produttori, per evitare che, ad esempio, la variabilità introdotta dall'impiego di lotti differenti di reagente possa marcatamente influenzare l'accuratezza dei risultati di sFLC (14).

In un articolo precedentemente pubblicato su questa rivista (12), avevamo valutato le prestazioni del sistema SPAPLUS (The Binding Site), considerato al tempo uno dei migliori sistemi di misura delle sFLC tra quelli commercialmente disponibili (15). L'esperienza aveva tuttavia mostrato la necessità di una maggiore attenzione da parte del produttore nell'assegnazione dei valori ai materiali di controllo del sistema e nella definizione dei loro intervalli di accettabilità al fine di meglio controllare possibili scostamenti sistematici nella misura. Inoltre, l'obiettivo prioritario rimaneva il miglioramento della precisione della misura, ribadito anche in una successiva esperienza maturata sul lungo termine (13).

Alla luce di tali problematiche, abbiamo più recentemente introdotto nel nostro laboratorio il sistema Optilite, reso disponibile all'inizio del 2016 da The Binding Site, che determina le sFLC in immunoturbidimetria, sempre con reagenti Freelite. In questo lavoro, ne presentiamo le prestazioni analitiche ottenute nella nostra pratica quotidiana, mediante l'analisi dei dati relativi ai programmi di CQI e VEQ eseguiti durante un lungo periodo di impiego clinico.

MATERIALI E METODI

Per la valutazione delle prestazioni del sistema Optilite abbiamo considerato i dati prodotti in un periodo di 12 mesi, durante il quale sono stati utilizzati 3 lotti di reagente differenti sia per sFLC κ (no. 405569, 401356 e 401357) che per sFLC λ (no. 405566, 401360 e 401363). Durante tutto il periodo, il sistema è stato utilizzato da un massimo di 6 tecnici in turnazione, in

maniera strettamente aderente alle raccomandazioni del produttore, inclusa l'effettuazione di tutte le procedure di manutenzione ordinaria e preventiva consigliate.

Per la stima dello scostamento sistematico dei risultati forniti dal sistema è stato utilizzato il materiale "Optilite control" (The Binding Site), a due livelli di concentrazione (L e H). Si tratta di un pool di sieri umani, fornito in forma liquida stabilizzata pronta all'uso. Dai singoli scostamenti percentuali derivati dal confronto dei risultati ottenuti durante le sedute di misurazione ($n=233$ per ciascun livello) con i valori del materiale assegnati dal produttore, sono stati ricavati gli scostamenti cumulativi medi, che sono stati confrontati con i traguardi di "bias" derivati dalla variabilità biologica dell'analita.

La riproducibilità della misura delle sFLC e della stima del rapporto κ/λ è stata valutata determinando in ogni seduta analitica la concentrazione delle sFLC, in un primo periodo (Maggio-Dicembre 2016, $n=125$) su un materiale di controllo liquido congelato commerciale (BioRad Liquichek Unassayed Chemistry Control Level 2, lotto no. 16622) e in un secondo periodo (Febbraio-Maggio 2017, $n=79$) su un pool di sieri congelato a -20 °C. I CV ottenuti sono stati confrontati con i traguardi di imprecisione derivati dalla variabilità biologica delle sFLC. È stata anche stimata separatamente l'imprecisione ottenuta con i diversi lotti di reagente utilizzati e definita l'eventuale diversità del comportamento tra lotti confrontando i risultati delle varianze ottenuti sullo stesso materiale mediante test F (test del rapporto delle varianze). In particolare, le misure effettuate sul materiale Liquichek hanno utilizzato due diversi lotti di reagente sia per sFLC κ che per sFLC λ , mentre per le misure del pool di sieri sono stati utilizzati due lotti di reagente solo per sFLC κ .

L'inaccuratezza della misura delle sFLC e del rapporto κ/λ è stata valutata utilizzando i risultati di 4 esercizi del programma di VEQ "UK-NEQAS", confrontando l'errore totale (ET) dei risultati forniti dal nostro laboratorio, calcolato come differenza percentuale tra il valore misurato e il valore della media dei dati forniti dai partecipanti alla VEQ utilizzando il sistema Optilite, con il traguardo di ET derivato dalla variabilità biologica delle sFLC.

La Tabella 1 riporta i traguardi analitici utilizzati per "bias", CV ed ET della misura delle sFLC (11). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite su programma MedCalc vers.17.2.

Tabella 1

Traguardi analitici per la misura delle catene leggere libere nel siero (sFLC) utilizzati nella valutazione del sistema Optilite. Dati derivati da rif. 11

| | Imprecisione (CV), % | | | Bias, % | | | Errore totale, % | | |
|------------------|----------------------|--------------|----------|--------------------|--------------|----------|--------------------|--------------|----------|
| | Livello di qualità | | | Livello di qualità | | | Livello di qualità | | |
| | Minimo | Desiderabile | Ottimale | Minimo | Desiderabile | Ottimale | Minimo | Desiderabile | Ottimale |
| sFLC κ | ≤6,0 | ≤4,0 | ≤2,0 | ±6,1 | ±4,1 | ±2,0 | ±16,1 | ±10,7 | ±5,4 |
| sFLC λ | ≤5,3 | ≤3,5 | ≤1,7 | ±10,6 | ±7,1 | ±3,5 | ±19,3 | ±12,9 | ±6,4 |
| κ/λ | ≤3,4 | ≤2,3 | ≤1,1 | ±6,0 | ±4,0 | ±2,0 | ±11,6 | ±7,7 | ±3,9 |

RISULTATI

La Figura 1 mostra i risultati relativi all'allineamento strumentale rilevato per tutta la durata dello studio (Maggio 2016-Maggio 2017) col materiale di controllo del produttore a due livelli di concentrazione. Il "bias" cumulativo medio ottenuto su tutto il periodo di valutazione risultava ottimale per sFLC κ [livello L: +1,1% (95% intervallo di confidenza (IC): $0,2 \div 2,1$) e livello H: -2,0% (IC: $-2,9 \div -1,0$)] e a livelli desiderabili per sFLC λ [livello L: +5,4% (IC: $4,6 \div 6,2$) e livello H: +0,1% (IC: $-0,7 \div 1,0$)]. Analizzando in specifico l'andamento dei dati, si può tuttavia notare un'influenza, seppur contenuta, delle ricalibrazioni all'interno del periodo di utilizzo dello stesso lotto (vedi, ad esempio, i dati del lotto più recente per sFLC κ nelle Figure 1A e B), come anche un saltuario problema di assegnazione dei valori per alcuni lotti di materiale di controllo (vedi i dati sFLC λ livello L con lotto intermedio in Figura 1C).

La Tabella 2 riporta i risultati della riproducibilità della misura delle sFLC e della stima del rapporto κ/λ . Confrontando i CV ottenuti su entrambi i materiali utilizzati (a concentrazioni molto simili) con gli obiettivi

riportati nella Tabella 1, si può notare che in nessun caso si raggiungeva l'obiettivo di qualità minimo per l'impiego clinico della misura, in special modo per quanto riguarda il rapporto κ/λ . Tuttavia, considerando la variabilità intra-lotto, le varianze ottenute sullo stesso materiale misurato con due lotti diversi mostravano una significativa diversità, mostrando per alcuni lotti CV all'interno degli obiettivi di qualità (Tabella 3).

La Tabella 4 riporta i risultati ottenuti con la partecipazione al programma di VEQ "UK-NEQAS". Tutti i risultati di sFLC κ e λ erano all'interno del traguardo di qualità desiderabile. Per quanto riguarda il rapporto delle sFLC, nell'esercizio no. 173, sebbene l'ET fosse pari a 18,8%, il dato si riferiva a un rapporto tra la catena leggera coinvolta e quella non coinvolta $>>100$ (soggetto con componente monoclonale IgG λ), comunque ben evidenziato anche dal dato da noi fornito.

DISCUSSIONE

La misura delle sFLC per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con discrasie plasmacellulari è

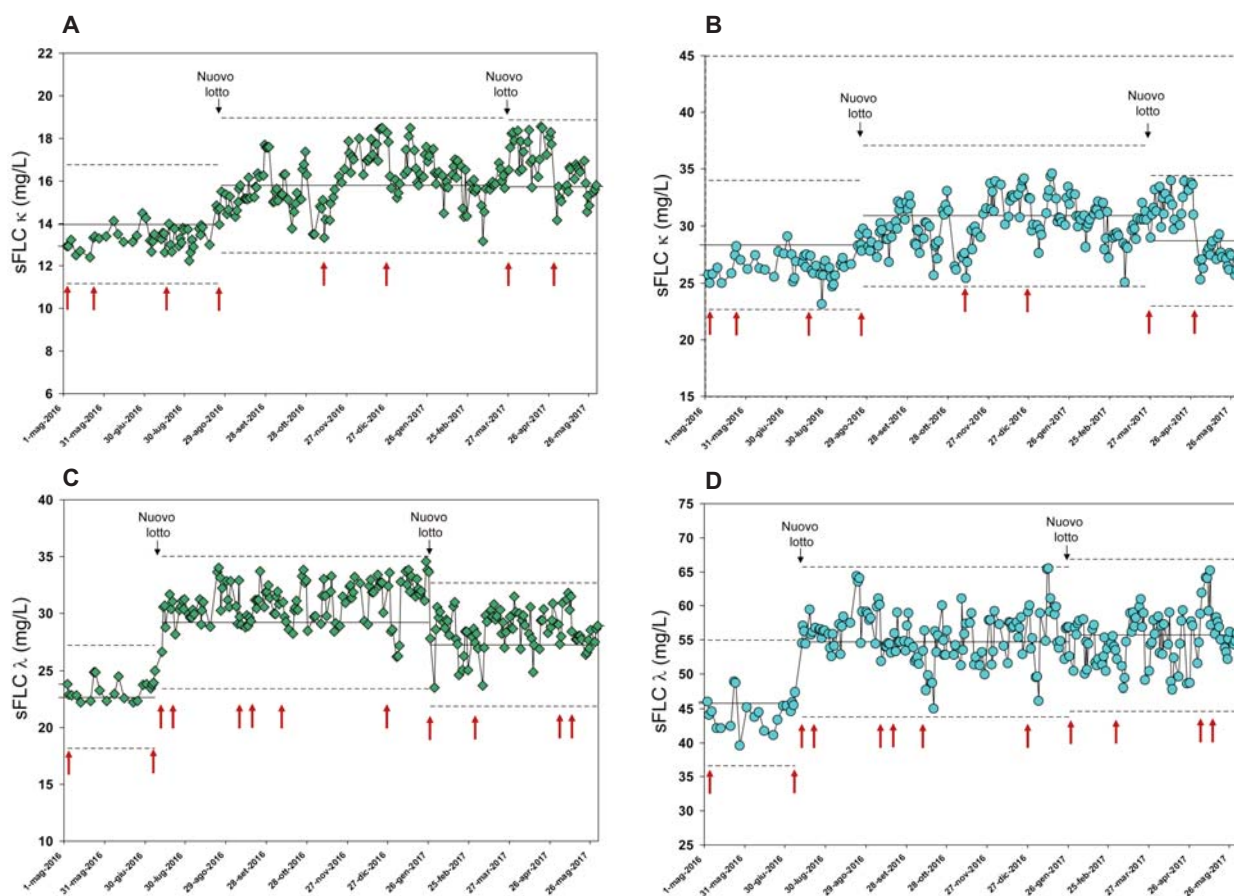


Figura 1

Valutazione dell'allineamento della misura delle catene leggere libere nel siero (sFLC) sul sistema Optilite nel periodo di studio mediante il materiale "Optilite control" a due livelli di concentrazione (L, riquadri A e C; H, riquadri B e D). I dati si riferiscono a 233 misurazioni per livello, effettuate nel corso di 12 mesi mediante l'impiego di 3 differenti lotti di reagente. Le linee continue orizzontali indicano il valore "target", le linee tratteggiate il rispettivo intervallo di accettabilità e le frecce rosse le calibrazioni.

Tabella 2

Risultati della riproducibilità del sistema Optilite nella misura delle catene leggere delle immunoglobuline nel siero (sFLC)

| Materiale | | sFLC κ mg/L | sFLC λ mg/L | κ/λ |
|---------------------------------------|-------|------------------|------------------|------|
| BioRad Liquichek (n=125 in 8 mesi) | Media | 11,8 | 14,9 | 0,79 |
| | CV% | 7,1 ^a | 7,8 ^a | 8,9 |
| Pool di sieri (n=79 in 4 mesi) | Media | 15,2 | 14,3 | 1,08 |
| | CV% | 6,6 ^a | 7,8 ^b | 10,2 |

^aOttenuto con due lotti di reagente.^bOttenuto con un lotto di reagente.**Tabella 3**

Variabilità intra-lotto della misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero (sFLC) con sistema Optilite

| Materiale | sFLC κ | | sFLC λ | | |
|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------|
| | Lotto 405569 (n=47) ^a | Lotto 401356 (n=78) ^a | Lotto 405566 (n=19) ^b | Lotto 401360 (n=106) ^c | |
| BioRad Liquichek | Media, mg/L | 11,3 | 12,0 | 14,8 | 15,0 |
| | CV% | 4,8 | 7,5 | 3,2 | 8,3 |
| | P | <0,001 | | <0,001 | |
| Pool di sieri | Media, mg/L | 14,6 | 15,8 | | |
| | CV% | 3,8 | 6,3 | | |
| | P | =0,001 | | | |

^aInclude 3 calibrazioni.^bInclude 2 calibrazioni.^cInclude 6 calibrazioni.^dInclude una calibrazione.**Tabella 4**

Valutazione dell'inaccuratezza della misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero (sFLC) e del loro rapporto mediante sistema Optilite. In grassetto, i risultati associati a errore totale maggiore del traguardo di qualità minima

| Esercizio VEQ/data ^a | Valore atteso ^b | | | Risultato fornito ^b | | | Errore totale | | |
|---------------------------------|----------------------------|----------------|------------------|--------------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|---------------|
| | sFLC κ mg/L | sFLC λ mg/L | κ/λ | sFLC κ mg/L | sFLC λ mg/L | κ/λ | sFLC κ mg/L | sFLC λ mg/L | κ/λ |
| 166/30.11.2016 (n=12) | 10,5 | 11,9 | 0,88 | 10,9 | 12,6 | 0,87 | +3,8% | +5,9% | -1,1% |
| 171/28.02.2017 (n=15) | 140,0 | 2,7 | 50 | 150,0 | 3,0 | 50 | +7,1% | +11,1% | 0% |
| 172/25.04.2017 (n=14) | 10,8 | 11,1 | 0,97 | 10,8 | 10,2 | 1,06 | 0% | -8,1% | +9,3% |
| 173/20.06.2017 (n=22) | 1,6 | 630,0 | 394 ^b | 1,5 | 702,7 | 468 ^b | -6,2% | +11,5% | +18,8% |

^aTra parentesi il numero di laboratori partecipanti appartenenti al gruppo The Binding Site Optilite.^bRapporto λ/κ.

ormai parte integrante della pratica clinica, poiché, essendo inclusa nelle raccomandazioni IMWG per la diagnosi del mieloma multiplo, può contribuire a influenzare la decisione clinica (2, 4). Tuttavia, è noto come le sFLC non siano analiti semplici da misurare per problemi in primis legati alla loro eterogeneità

fisiopatologica, che condiziona la selettività metodologica, che a sua volta si traduce in variabilità tra lotti di reagente, effetti da eccesso di antigene, non linearità e scarsa sensibilità della risposta analitica, sia che vengano utilizzati per le misure anticorpi policlonali che monoclonali (6, 14). Inoltre, mancando un sistema di

riferimento internazionale a cui tracciare le misurazioni, i risultati ottenuti da metodi differenti, ma anche con lo stesso metodo applicato a piattaforme analitiche differenti, spesso non sono confrontabili (5, 8).

Alla luce di queste premesse, si comprende l'importanza di verificare le caratteristiche di attendibilità analitica dei sistemi di misura utilizzati per le sFLC, confrontandole con le specifiche di prestazione analitica raccomandate per la loro applicazione clinica. Mancando dati relativi all'impatto della prestazione analitica sugli esiti clinici, in accordo con quanto raccomandato dalla Conferenza Strategica tenutasi a Milano nel 2014 (16), in questo studio, come già nei precedenti effettuati dal nostro gruppo (12, 13), abbiamo utilizzato gli obiettivi derivati dalla variabilità biologica delle sFLC, precedentemente definiti con uno studio *ad hoc* (11). È da notare che la mancanza di un sistema di riferimento metrologico di ordine superiore ci ha costretto ad affrontare la valutazione di "bias" e inaccuratezza del sistema analitico in modo relativo e non assoluto, non potendo contare su una gerarchia di materiali e/o metodi di riferimento internazionalmente riconosciuti a cui fare riferimento (5, 17).

Per valutare l'eventuale scostamento sistematico della misura nel lungo periodo, abbiamo utilizzato il materiale di controllo offerto dal produttore all'interno del sistema commerciale. Come precedentemente riportato (17, 18), questo materiale di controllo, in ottemperanza al concetto di riferibilità metrologica (e, conseguentemente, all'applicazione della Direttiva Europea sui diagnostici *in vitro*), deve obbligatoriamente entrare a far parte, insieme ad analizzatore, reagenti e calibratori, del sistema di misura complessivamente inteso ("CE marked"), al fine di permettere la valutazione dell'allineamento dello stesso a quanto dichiarato dal produttore. Lo scostamento cumulativo medio dei risultati forniti dal sistema Optilite si posizionava in maniera ottimale all'interno del traguardo stabilito per entrambe le sFLC. Sembra quindi che il produttore abbia rivolto una maggiore attenzione (con qualche eccezione: vedi livello L sFLC λ lotto 401360) all'assegnazione dei valori al materiale di controllo del sistema analitico, rispetto a quanto evidenziato con il sistema SPAPLUS nel nostro precedente lavoro (12). Questi risultati indicano come il sistema Optilite risulti idoneo per l'interpretazione trasversale dei risultati di sFLC attraverso l'impiego di livelli decisionali fissi. Questo aspetto, associato al fatto che tutte le linee guida correnti riportano livelli decisionali derivati con metodo Freelite, rende il sistema Optilite raccomandabile per le principali applicazioni cliniche della determinazione delle sFLC e del loro rapporto, quali: a) rapporto tra catena leggera coinvolta e non coinvolta ≥ 100 come predittore di imminente progressione da mieloma "smoldering" a mieloma multiplo (2, 19); b) concentrazione di sFLC monoclonale > 500 mg/L come predittore di danno renale acuto (tubulopatia interstiziale) in corso di mieloma multiplo (20); c) concentrazione di sFLC monoclonale > 100 mg/L come criterio di 'malattia misurabile' nel mieloma oligosecemente, che conferisce al paziente il requisito per essere inserito in specifici protocolli clinici (21).

I risultati della riproducibilità delle misure riportati nel nostro lavoro sono espressione di tutte le possibili fonti di variabilità rilevabili in un contesto operativo reale in un lasso di tempo significativamente ampio, quali cambio del lotto dei reagenti, ricalibrizioni, rotazione del personale tecnico, e così via. I valori di CV così rilevati risultano quindi poco comparabili a quelli ottenuti in altri studi, in cui gli esperimenti di valutazione "nella serie" e "tra le serie" sono condotti in tempi molto più brevi e su un numero di determinazioni molto più limitato (22). La modalità adottata in questo studio è, tuttavia, l'unica in grado di fornire un dato di riproducibilità sufficientemente robusto. In accordo con Braga e Panteghini (17), il dato valutato consente di monitorare l'affidabilità del sistema commerciale impiegato mediante la stima della quota di incertezza della misura dovuta agli effetti casuali, che include l'imprecisione del sistema analitico e la prestazione del singolo laboratorio in termini di variabilità. Tale componente fornisce, attraverso meccanismi di valutazione retrospettiva, dati utili alla conoscenza della variabilità del sistema analitico e del suo utilizzo quotidiano da parte del singolo laboratorio. Questo tipo di valutazione deve essere completamente indipendente dal programma utilizzato per la valutazione dell'allineamento del sistema, a partire dal materiale impiegato che deve essere di terza parte (17).

I risultati ottenuti indicano che la misura delle sFLC mediante il sistema Optilite non è in grado di raggiungere una riproducibilità che rispetti l'obiettivo di qualità minimo per l'impiego clinico della misura. Il dato si mostrava indipendente dal tipo di materiale utilizzato, essendo simile sia con l'impiego di un materiale commerciale (BioRad Liquichek) che con l'impiego di un pool di sieri preparato ad hoc. Questo indirettamente testimonia la commutabilità del primo per la misura delle sFLC e ne giustifica, essendo pronto all'uso, l'utilizzo in alternativa al meno comodo, anche se commutabile, pool di sieri. Confrontando i dati di CV con quelli ottenuti precedentemente con lo strumento SPAPLUS utilizzando questo materiale (12), lo strumento Optilite presenta un miglioramento solo per le sFLC κ (7,1% vs. 10,6%), mentre per sFLC λ e rapporto κ/λ i dati sono sovrapponibili. I nostri dati mostrano che alla base dell'insufficiente riproducibilità delle misure di sFLC con Optilite si situa principalmente il cambiamento del lotto di reagente, anche se un effetto non trascurabile sulla variabilità dei risultati era anche probabilmente dovuto al numero delle calibrizioni intra-lotto effettuate. Siamo consci che, rispetto a quanto precedentemente raccomandato (17), una limitazione potrebbe essere rappresentata dalle concentrazioni dei parametri misurati nel materiale utilizzato. Sarebbe infatti di fondamentale importanza determinare la riproducibilità del sistema non solo a concentrazioni fisiologiche di sFLC, ma anche a valori che corrispondono ai livelli decisionali utilizzati nella pratica clinica (sFLC ~ 100 mg/L e/o rapporto $\kappa/\lambda \sim 100$), perché a queste concentrazioni il CV potrebbe essere significativamente diverso. A margine di questa prima valutazione, è nostra intenzione infatti aggiungere un pool aggiuntivo per

poter valutare la variabilità analitica con la componente λ del CQI anche a concentrazioni più prossime ai valori considerati critici per lo stato clinico del paziente.

Uno studio da poco pubblicato sulle prestazioni dell'analizzatore Optilite con reagente Freelite, in un esperimento durato solo 10 giorni che includeva un totale di 4 misurazioni su due sieri di pazienti, con condizioni, quindi, molto più stabili (e meno realistiche) delle nostre, ha riportato CV tra le serie, non molto dissimili da quelli ottenuti nel nostro studio valutando la variabilità intra-lotto (CV sFLC κ : 4,4% e 8,0%; CV sFLC λ : 4,6% e 3,7%) (22).

Nel monitoraggio delle condizioni cliniche, la conoscenza della differenza critica è di cruciale importanza per la valutazione del significato dei cambiamenti riscontrati in risultati ottenuti dall'analisi di campioni seriali dello stesso individuo (11). Nella valutazione della differenza critica per le sFLC l'influenza del CV analitico sul dato calcolato assume un ruolo centrale e probabilmente preponderante, perché l'imprecisione della misurazione può variare, e di molto, tra metodo e metodo (23). Sulla base dei dati prodotti in questo studio, è possibile constatare che la prestazione metodologica del sistema Optilite non è probabilmente del tutto adeguata per il monitoraggio a lungo termine dei pazienti e l'interpretazione delle variazioni dei valori di sFLC nell'individuo mediante l'impiego della differenza critica.

Come già fatto in precedenza (12), in questo studio abbiamo valutato l'ET dei risultati forniti considerando lo scostamento rispetto al valore di tendenza centrale dei dati forniti dal gruppo Optilite in una VEQ internazionale. Con l'eccezione di un dato in un esercizio relativo a un rapporto κ/λ molto alterato, peraltro ben rilevato anche dal risultato da noi fornito, tutti i risultati hanno rispettato il traguardo di ET al livello desiderabile di qualità. Questo sembra indicare che, nella misura in singolo, la pur ampia imprecisione del sistema Optilite viene sufficientemente compensata dal basso errore sistematico, fornendo un ET della misura accettabile.

Rispetto al sistema SPAPLUS, lo strumento Optilite non presenta il problema di marcata sottostima in caso di concentrazioni di sFLC <4 mg/L (12). L'intervallo di misura delle sFLC su Optilite è molto più esteso arrivando a ~1 mg/L, come (seppur indirettamente) dimostrano anche i dati della VEQ in Tabella 4, assicurando la possibilità di calcolare in maniera accurata il rapporto κ/λ anche nei soggetti con marcata monoclonalità nei quali la sFLC non coinvolta è spesso molto bassa a causa dello stato di immunosoppressione del paziente (5).

In conclusione, in base ai dati del presente studio, possiamo affermare che, rispetto a precedenti esperienze, The Binding Site ha recentemente rivolto più attenzione alla corretta assegnazione dei valori ai materiali di controllo del sistema e, con l'introduzione di Optilite, ha corretto il problema dell'errato recupero delle basse concentrazioni di sFLC. Questo consente di applicare correttamente la misura delle sFLC e la stima del loro rapporto secondo quanto riportato nelle linee

guida e nelle indicazioni internazionali (2, 19-21). Al contrario, la riproducibilità della misura delle sFLC, anche con il sistema Optilite, non è ancora soddisfacente per consentire di applicarne la determinazione nel monitoraggio a lungo termine del paziente con discrasia plasmacellulare già diagnosticata.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Graziani MS, Merlini G. Serum free light chain analysis in the diagnosis and management of multiple myeloma and related conditions. *Expert Rev Mol Diagn* 2014;14:55-66.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-48.
- Dolci A, Vernocchi A, per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine. Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2012;36:84-9.
- Caldini A, Graziani MS. L'aggiornamento dei criteri per la diagnosi di mieloma multiplo da parte dell'International Myeloma Working Group". *Biochim Clin* 2015;39:275-80.
- Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1021-30.
- Carr-Smith HD, Jenner EL, Evans JAR, et al. Analytical issues of serum free light chain assays and the relative performance of polyclonal and monoclonal based reagents. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:997-1003.
- Messiaen AS, De Sloovere MMW, Claus PE, et al. Performance evaluation of serum free light chain analysis. Nephelometry vs turbidimetry, monoclonal vs polyclonal reagents. *Am J Clin Pathol* 2017;147:611-22.
- Cigliana G, Gulli F, Napodano C, et al. Serum free light chain quantitative assays: dilemma of a biomarker. *J Clin Lab Anal* 2017. doi: 10.1002/jcla.22243. [Epub ahead of print].
- White-Al Habeeb NMA, Earle T, Spencer M, et al. Evaluation of the N-latex serum free light chain assay on the Siemens BNII analyzer and agreement with The Binding Site FreeLite assay on the SPAPLUS. *Clin Biochem* 2017. pii: S0009-9120(16)30690-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.009. [Epub ahead of print].
- Dolci A, Panteghini M. Catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero: un marcatore a metà del guado. *Biochim Clin* 2013;37:344-6.
- Braga F, Infusino I, Dolci A, et al. Variabilità biologica delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero. *Biochim Clin* 2013;37:376-82.
- Infusino I, Dolci A, Panteghini M. Valutazione delle prestazioni del sistema analitico SPAPLUS per la misura della catene leggere libere del siero. *Biochim Clin* 2013;37:370-5.
- Braga F, Dolci A, Panteghini M. Long-term imprecision performance of SPAPLUS serum free light chain assays evaluated against goals derived from biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:eA285-6.
- Tate J, Mollee P. Towards improved measurement of serum free light chains: clinical and laboratory issues. *Biochim Clin* 2013;37:395-404.

15. Cha KH, Sim YB, Chae H, et al. The analytical performance evaluation of Freelite human kappa free and human lambda free on the SPAPLUS immunoturbidimetric analyzer. *J Clin Lab Anal* 2014;28:229–36.
16. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:833–5.
17. Braga F, Panteghini M. Riferibilità metrologica come strumento per la standardizzazione delle misure in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:551-8.
18. Braga F, Panteghini M. Verifica della riferibilità metrologica dei dispositivi medico-diagnostici in vitro: responsabilità e strategie. *Biochim Clin* 2013;37:470-8.
19. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, et al. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia* 2015;29:751–3.
20. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:43–51.
21. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467–73.
22. Ghillani P, Dufat L, Sterlin D, et al. Analytical performances of Optilite® turbidimeter (The Binding Site): a new dedicated analyser for specific proteins determination. *Ann Biol Clin* 2017;75:29-37.
23. Wang L, Chan PCR. Measurement uncertainty for serum free light chain assays: estimation and implication on result interpretation. *Clin Biochem* 2013;46:381-4.

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

Giulia Sancesario¹, Manuela Gibellini², Sofia Toniolo³, Simona Di Santo^{1,3}, Davide Chiasserini⁴, Gaetano Bernardi⁵ per il Gruppo di Studio SIBioC Liquidi Cavitari, Massimo Musicco⁶ per la Piattaforma Italiana per le Malattie Neurodegenerative (ITALPLANED) della Società Italiana di Neurologia per le Demenze (SINdem), Lucilla Parnetti⁴, Carlo Caltagirone^{1,3}, Sergio Bernardini^{2,8}

¹Dipartimento di Neurologia Clinica e Comportamentale, Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

²Dipartimento di Biochimica Clinica, Università di Roma Tor Vergata, Roma

³Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia

⁴VU University Medical Center, Amsterdam

⁵Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico C. Besta, Milano, Italia

⁶Unità di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Tecnologie Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano, Italia

⁷Dipartimento di Medicina, Centro dei Disturbi della Memoria, Università di Perugia, Italia

⁸Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia

ABSTRACT

The clinical use of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: an Italian survey. The use of cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers amyloid β_{1-42} ($A\beta_{42}$), tau (T-tau), and phosphorylated tau (p-tau₁₈₁) for the diagnosis of Alzheimer's Disease is limited to a restricted number of neurological centers. By a survey, we aimed to do a "selfie" of the use and diffusion of CSF biomarkers of dementia in Italy, the standardization of pre-analytical procedures, the harmonization of ranges, and the participation to Quality Control programs. The members of SIBioC and of the Piattaforma Italiana per le Malattie Neurodegenerative della Società Italiana di Neurologia per le Demenze (SINdem-ITALPLANED) together with other neurological clinics all over Italy have received an online questionnaire. Forty neurological centers require CSF analyses while 7/20 regions (35%) lack CSF laboratories. Standardization of pre-analytical procedures is present in 62.02% of laboratories and only 56% participate to International Quality Control Programs. There is no harmonization of the reported cut-offs. A cost-benefit analysis, with a program for standardization and harmonization should be promoted by Scientific Societies and National Health Services.

INTRODUZIONE

L'analisi dei biomarcatori di neurodegenerazione, β amiloide₄₂ ($A\beta_{42}$), tau totale (T-tau) e tau fosforilata (p-tau₁₈₁), offre un notevole valore aggiunto nella diagnosi di malattia di Alzheimer (1). Infatti, la variazione delle concentrazioni di tali proteine nel liquido cefalorachidiano (LCR) fornisce l'evidenza *in vivo* delle modificazioni istopatologiche caratteristiche della malattia, ovvero la formazione di placche extracellulari di β amiloide e di grovigli neuro fibrillari di tau e fosfo-tau. Questo si riflette nel LCR dei pazienti con "Alzheimer's Disease" (AD) con una tipica riduzione della concentrazione di $A\beta_{42}$, insieme all'aumento di T-tau e p-tau₁₈₁, un pattern comunemente

definito "AD signature" (6). La valutazione di questi marcatori permette di discriminare forme di demenza di tipo AD da demenze di altra origine e di identificare quelle forme di deterioramento cognitivo lieve che evolveranno in demenza di tipo AD.

L'utilizzo dei biomarcatori liquorali, insieme ai marcatori topografici [risonanza magnetica (RMN) che si avvale di sofisticati traccianti per la β amiloide Pittsburgh B (PiB)] è stato incluso nelle raccomandazioni dell'International Working Group (IWG) e del National Institute on Aging-Alzheimer' Association statunitense per la diagnosi di AD (2). Inoltre, le linee guida dell'European Federation of Neurological Societies (EFNS) raccomandano l'analisi dei biomarcatori del LCR nella

Corrispondenza a: Giulia M. Sancesario, Dipartimento di Neurologia Clinica e Comportamentale, Fondazione Santa Lucia, Via Ardeatina 306/354, 00142 Roma. Tel. +390620902259, fax +390620902349, e-mail giulia.sancesario@gmail.com

Ricevuto: 25.09.2017

Revisionato: 22.11.2017

Accettato: 29.11.2017

Pubblicato on-line: 30.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.007

diagnosi differenziale tra la forma tipica e atipica di AD (7).

Nonostante il valore aggiunto dei biomarcatori per una diagnosi precoce e differenziale, in Italia la diffusione del loro utilizzo nella pratica clinica è limitata e il loro uso è piuttosto ristretto in Centri specializzati.

Per valutare la reale diffusione dell'esame liquorale nella pratica clinica, SIBioC insieme alla piattaforma italiana per le demenze della Società Italiana di Neurologia per le Demenze (SINdem-ITALPLANED) hanno effettuato una verifica della situazione in Italia attraverso un sondaggio che è stato spedito ai rispettivi soci. Nel questionario sono stati inoltre considerati diversi aspetti della standardizzazione della fase pre-analitica e dell'armonizzazione, la partecipazione ai programmi di controllo di qualità e i metodi utilizzati in ognuno dei laboratori partecipanti al sondaggio.

METODI

Un questionario è stato elaborato dal Gruppo di studio sui liquidi cavitari di SIBioC, e da SINdem-ITALPLANED e approvato dalle rispettive Società. 1815 questionari sono stati inviati via e-mail a tutti i soci SIBioC e ITALPLANED distribuiti in tutte le regioni italiane, durante il periodo Aprile-Giugno 2016.

Il questionario è stato realizzato con Survey Monkey. I dati sono stati raccolti, analizzati in forma anonima e, dopo l'esclusione di quelli pervenuti dagli stessi laboratori, le risposte totali sono state riportate in percentuali. Le concentrazioni dei biomarcatori nel LCR sono espresse in ng/L; l'intervallo di normalità e i valori soglia sono riportati come valore minimo-massimo o media e deviazione standard.

RISULTATI

La distribuzione e l'attività dei laboratori del LCR

Basandoci sui dati raccolti, abbiamo disegnato una

mappa dei laboratori che effettuano l'analisi dei biomarcatori del LCR per le malattie neurodegenerative in Italia. I dati principali sono riportati in Tabella 1.

L'analisi del LCR per i biomarcatori di AD è attualmente eseguita in 25 laboratori, che possono essere distinti in laboratori interni, che effettuano le analisi solo per pazienti afferenti al proprio ospedale (10/25), e laboratori centralizzati (15/25) che eseguono l'analisi dei biomarcatori anche per una rete di ospedali situati nelle vicinanze. In aggiunta, 15 ospedali che non dispongono di un laboratorio interno per l'esame del LCR, inviano i campioni a un laboratorio esterno situato nella stessa città o in una vicina. Pertanto possiamo concludere che nel complesso i laboratori interni o centralizzati possono provvedere all'analisi del LCR per questi biomarcatori per un totale di 40 Centri.

Il numero di campioni di LCR analizzati ogni mese da ciascun laboratorio è generalmente basso. Escludendo pochi laboratori dove la quantità delle determinazioni è maggiore di 20 per mese, dei restanti laboratori, circa metà analizza meno di 10 campioni al mese, e l'altra meno di 20 (Tabella 1).

Per verificare di aver intervistato tutti i laboratori che in Italia effettuano l'esame liquorale dei biomarcatori, abbiamo scelto un metodo indiretto rivolgendoci a "Fujirebio-Innogenetic" e "Euroimmun", le due maggiori compagnie europee che dispongono di saggi per i marcatori liquorali, le quali hanno confermato i dati raccolti nel nostro sondaggio.

I 25 laboratori che eseguono l'analisi hanno una distribuzione a macchia di leopardo, con una maggiore presenza al Nord, intermedia al Centro e minore al Sud e nelle isole (Figura 1). In particolare, i laboratori centralizzati (n=15) sono distribuiti in 11 regioni. Sorprendentemente, in 7 regioni (35% delle regioni Italiane) non sono presenti laboratori che determinano i biomarcatori del LCR: tre regioni sono al Nord, una al Centro e tre al Sud. Tutte le 7 regioni dove mancano i laboratori per l'analisi dei biomarcatori del LCR sono allo stesso tempo mancanti della sezione regionale del SINdem.

Tabella 1

Risultati riassuntivi del questionario inviato

| Centri che utilizzano i biomarcatori | Laboratori centralizzati 15 | Laboratori interni 10 | Ospedali che inviano il campione di LCR 15 |
|---|--------------------------------|--------------------------|---|
| Laboratori associati a CDCD | Si 32,5% | No 67,5% | |
| Numero di campioni/mese [§] | Meno di 10 41,66 % | Meno di 20 45,83% | Più di 20 12,50% |
| Standardizzazione delle procedure pre analitiche* | Si 62,02% | No 37,98% | |
| Controllo di qualità esterno [§] | Si 56% | No 44% | |

I laboratori centralizzati provvedono all'analisi dei biomarcatori per una rete di ospedali vicini; i laboratori interni provvedono all'analisi dei biomarcatori del LCR per i pazienti del proprio Ospedale.

I risultati sono riportati in percentuale dei questionari raccolti () o dei laboratori che determinano i biomarcatori (n=40) (§). CDCD, Centri dei disturbi cognitivi e della demenza; LCR, liquido cefalo-rachidiano.*



Figura 1
Distribuzione dei Centri che utilizzano i biomarcatori del LCR nella diagnosi di AD.

Biomarcatori del LCR e Centri regionali dei disturbi della memoria

In Italia esistono 333 Centri neurologici (fonte: Società Italiana di Neurologia); tra questi, solo il 12% (40/333) richiede la determinazione liquorale dei biomarcatori di neurodegenerazione per la diagnosi di demenza. Inoltre, è interessante notare che solo il 32,5% degli ospedali che usano i biomarcatori del LCR (n=13) ospitano Centri dei disturbi cognitivi e della demenza (CDCD), e quindi le analisi dei biomarcatori di neurodegenerazione non sono utilizzate esclusivamente da Centri specializzati nella diagnosi di deterioramento cognitivo.

Procedure pre-analitiche e controllo qualità

L'utilizzo di procedure pre-analitiche standardizzate è cruciale per ottenere risultati affidabili e comparabili dei biomarcatori del LCR tra diversi Centri. Tali procedure includono ad esempio le procedure operative standard per la raccolta e l'analisi del LCR, incluso il monitoraggio della temperatura durante il trasporto del campione, l'uso dei corretti contenitori di propilene, la centrifugazione dei campioni a temperatura refrigerata prima della conservazione, e così via. I dati raccolti mostrano che solo il 62,02% dei laboratori partecipanti al sondaggio adotta procedure standardizzate nella fase pre-analitica. Solo metà dei laboratori partecipa a un programma di controllo di qualità internazionale [quali ad esempio l'Alzheimer's Association, Quality control, o EU Joint Program Neurodegenerative Disease Research (JPND)].

Valori di riferimento dei biomarcatori

Un notevole limite alla diffusione dei biomarcatori

Tabella 2

Valori di riferimento per i biomarcatori liquorali A β ₄₂, t-tau e p-tau adottati nei Laboratori che hanno partecipato all'indagine

| Biomarcatori | Valori di riferimento (ng/L) | Laboratori (n) |
|-------------------------|------------------------------|----------------|
| A β ₄₂ | >450 | 2 |
| | >500 | 10 |
| | >550 | 4 |
| | 567-1022 | 1 |
| | >600 | 1 |
| | 790±228 | 1 |
| | T-tau | <300 |
| | <350 | 3 |
| | <375 | 2 |
| | <400 | 1 |
| | <450 | 4 |
| | <500 | 1 |
| | 170-512 | 2 |
| | 243±127 | 1 |
| p-tau ₁₈₁ | <35 | 1 |
| | 33-66 | 1 |
| | <52 | 2 |
| | <61 | 11 |
| | <65 | 1 |
| | <67 | 1 |

nella pratica clinica è l'ampia eterogeneità dei valori di riferimento, che rende difficile l'utilizzo dei risultati nel caso in cui l'esame venga interpretato in un Centro diverso rispetto a quello in cui è stato eseguito (Tabella 2). Le differenze maggiori si riscontrano nei valori di A β ₄₂, il cui valore soglia nella popolazione adulta (52-70 anni) oscilla tra 450 e 550 ng/L nella maggior parte dei laboratori (n=16); si osservano tuttavia valori anche molto diversi (Tabella 2). Differenze sono riscontrate anche per la proteina tau totale (valore soglia tra 300 e 500 ng/L). In ultimo, per la p-tau₁₈₁ il valore superiore dell'intervallo di riferimento è generalmente tra 61-67 ng/L (Tabella 2). La mancanza di studi multicentrici e su larga scala costituisce un limite verso la armonizzazione dei valori di riferimento che sono attualmente definiti in base alle esperienze dei singoli Centri oppure alle indicazioni fornite dal produttore dei kit diagnostici.

Tale variabilità è osservata nonostante vengano usate per la determinazione metodiche ELISA, commercializzate da sole due ditte (Fujirebio-Innogenetics e Euroimmun). Con l'introduzione di sistemi automatizzati in chemiluminescenza, che eliminano le differenze in fase analitica, si potrebbe raggiungere una maggiore uniformità.

Attualmente i biomarcatori del LCR non sono rimborsati dal Servizio Nazionale Sanitario in tutta Italia, con l'eccezione dell'Umbria. Questo costituisce sicuramente un ostacolo alla diffusione dell'analisi.

Altri esami liquorali

Attualmente, la puntura lombare per l'esame liquorale è utilizzata nella pratica clinica per la diagnostica di diverse patologie del sistema nervoso centrale. L'esame cito-morfochimico viene eseguito nel 75,61% dei laboratori, la ricerca delle bande oligoclonali, impiegate nella diagnosi di sclerosi multipla, nel 52,78%. Al contrario, gli esami di altri marcatori che sono coinvolti nello studio e nella diagnosi delle patologie neurodegenerative sono più limitati. La β amiloide 1-40 ($A\beta_{40}$), che permette di normalizzare le variazioni di $A\beta_{42}$ dovute alla malattia di Alzheimer, calcolando il rapporto $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ che aumenta l'accuratezza diagnostica di questi biomarcatori, è impiegata nel 12,19% dei Centri. Allo stesso modo, l'alpha-sinucleina, un marcatore delle sinucleopatie, viene usata solo nel 7,31% dei Centri, mentre la proteina 14-3-3, un marcatore liquorale normalmente utilizzato nella diagnosi della malattia di Creutzfeldt-Jakob, è impiegato nel 3,65% dei laboratori. Anche l'uso dei biomarcatori plasmatici nella diagnosi delle malattie neurodegenerative è limitato: il polimorfismo dell'Apolipoproteina E (ApoE), il maggiore fattore di rischio per AD, è effettuato nel 18,29% dei laboratori; la determinazione della progranulina sierica, un marcatore di alcune forme di demenze frontotemporali, solo nell'8,5%

DISCUSSIONE

L'analisi dei biomarcatori liquorali è di sicuro supporto per una diagnosi precoce e differenziale della malattia di Alzheimer e altre forme di demenza, fornendo l'evidenza *in vivo* della neurodegenerazione. Tuttavia, il loro impiego nella pratica clinica è limitato, a causa anche della mancanza di standardizzazione e armonizzazione dei valori di riferimento.

I dati ottenuti nella nostra indagine mostrano che in Italia solo 25 laboratori eseguono l'analisi dei biomarcatori, mentre la loro determinazione in totale viene utilizzata in 40 Centri distribuiti in 13 delle 20 regioni italiane (65%) (dati aggiornati al settembre 2016). Durante l'ultimo anno, circa 10 nuovi Centri hanno introdotto l'esame liquorale dei biomarcatori; alcuni di questi con sistemi automatizzati in chemiluminescenza. In molte regioni c'è almeno un laboratorio che esegue i biomarcatori liquorali ma nonostante ciò, il numero di campioni che giungono ai laboratori centralizzati dagli ospedali esterni è relativamente basso.

In conclusione, in Italia sono 40 i Centri clinici che utilizzano l'analisi dei biomarcatori del LCR per lo studio della demenza, rappresentando il 12% dei 333 Centri ufficiali di neurologia. La mappa dei laboratori che eseguono i biomarcatori del LCR mostra una distribuzione a macchia di leopardo, con numerosi Centri

in alcune regioni che sono assenti in altre. In alcune regioni ci sono reti di laboratori che favoriscono la diffusione dell'utilizzo dei biomarcatori nei Centri specializzati, che possono usufruire di una diagnosi più accurata grazie all'invio dei campioni presso laboratori centralizzati. L'uso dei biomarcatori in alcune regioni non è limitato agli ospedali altamente specializzati poiché soltanto il 32,50% dei Centri che effettuano l'esame dei biomarcatori del LCR hanno un Centro dei disturbi della memoria.

Globalmente questi dati confermano che i biomarcatori del LCR non sono ancora considerati nella pratica clinica quotidiana e che il loro esame è limitato ai Centri che raccolgono i clinici, gli psicologi e i laboratori specializzati dedicati alla diagnosi e al trattamento della demenza (5). La ragione delle limitazioni nell'uso di questi biomarcatori nelle differenti regioni italiane potrebbe essere multifattoriale, in parte attribuibile a ragioni di carattere economico, legato all'assenza del rimborso da parte del servizio sanitario regionale, e in parte alla mancanza di omogeneità delle indicazioni cliniche e di una armonizzazione sui valori soglia.

Un altro ostacolo alla diffusione può essere rappresentato dalla necessità di eseguire una puntura lombare anche se alcuni studi clinici mostrano che questa è una pratica sicura e accettabile, con una bassa incidenza di pazienti che necessitano di un intervento medico (3). In effetti è una procedura praticata frequentemente a scopo diagnostico per altre malattie neurologiche, come dimostra la diffusione dell'analisi cito-morfo-chimica e la ricerca delle bande oligoclonali (stimato rispettivamente nel 75,61% e 52,78% di tutti i laboratori).

Un importante problema emerso dal nostro studio è che un ridotto numero di laboratori segue procedure standardizzate nelle fasi pre-analitica e analitica. Le variabili pre-analitiche che possono influenzare la misurazione finale dei biomarcatori possono includere, per esempio, il tipo di contenitore utilizzato, ripetuti cicli di congelamento/scongelo, la durata del congelamento. Per questo è stato proposto un consenso dai membri di Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative (ABSI), al fine di minimizzare le differenze dovute alle procedure pre-analitiche, seguito da un'intesa sull'uso clinico dei biomarcatori del LCR (8). Questo è un punto cruciale per raggiungere l'armonizzazione tra laboratori e la standardizzazione delle modalità per l'invio dei campioni ai laboratori centralizzati.

Abbiamo trovato un'ampia variabilità nei valori soglia proposti per i tre differenti biomarcatori che può causare difformità nella valutazione dei referti tra i Centri (variabilità del 20-30%). Metà dei laboratori intervistati partecipa a un programma di controllo esterno di qualità. E' necessario un piano per la armonizzazione dei valori soglia tra le regioni italiane per aumentare la comparabilità dei risultati e permettere la realizzazione di studi multicentrici. Attualmente le differenze tra i valori soglia dei biomarcatori del liquor per l'AD rappresentano

una sostanziale difficoltà in vista di un uso clinico di routine.

L'uso dei biomarcatori del LCR è in espansione nei paesi occidentali, anche se il reale impiego nella pratica clinica non è mai stato valutato negli altri paesi. Per esempio, negli Stati Uniti i biomarcatori del LCR sono raramente utilizzati nella pratica clinica ma sono comunemente richiesti nella ricerca o per l'inclusione dei pazienti nei trials clinici. In Francia ne è consentito l'uso dall'agenzia governativa per la diagnosi dei diversi stadi di demenza di tipo AD, nei pazienti giovani e con presentazioni cliniche atipiche. In Svezia, i biomarcatori del LCR sono largamente utilizzati per la diagnosi clinica di AD già dal 1995. Attualmente il loro uso in Europa non è omogeneo con una conseguente differenza nell'accuratezza diagnostica così come osservato in Italia (4).

In conclusione, i nostri dati ci mostrano come l'uso dei biomarcatori del LCR sia ancora limitato nella pratica clinica e solo un ridotto numero di pazienti in Italia riceve una diagnosi integrata clinico-biochimica. Gli ostacoli alla diffusione dei biomarcatori del LCR nella pratica clinica possono essere rappresentati da: difficoltà e pregiudizi sull'esecuzione di una puntura lombare nei pazienti con demenza; mancanza di standardizzazione della fase pre-analitica e della fase analitica; variabilità dei valori soglia tra i diversi Centri. Una più accurata diagnosi clinico-biochimica nei pazienti con AD può supportare l'uso di una appropriata terapia, estendendo l'interesse dei biomarcatori del liquor non solo ai trials di ricerca ma anche alla pratica clinica.

Un limite dello studio è la possibile sottostima dei Centri che effettuano o richiedono l'esame ai laboratori centralizzati, nel caso non avessero ricevuto il questionario o non vi abbiano risposto. Pertanto, il numero di Centri clinici che utilizzano i test per i biomarcatori del LCR potrebbe essere superiore a quello riportato.

Per ottimizzare e ampliare l'uso dei biomarcatori nella pratica clinica dovrebbe essere promossa dalle Società Scientifiche e i servizi di sanità pubblica internazionali, un'analisi costo-beneficio oltre a un programma di armonizzazione e interpretazione dei risultati.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i soci della SIBioC e del SINDem-ITALPLANED che hanno partecipato al sondaggio. Un ringraziamento a Federica Vergani e a Claudia Agosta per il loro supporto nell'elaborazione del sondaggio.

Questo studio è stato supportato dal Ministero della Salute Italiano GR-2011-02349822.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Blennow K, Dubois B, Fagan AM, et al. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2015;11:58-69.
2. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 2014;13:614-29.
3. Duits FH, Martinez-Lage P, Paquet C, et al. Performance and complications of lumbar puncture in memory clinics: Results of the multicenter lumbar puncture feasibility study. *Alzheimers Dement* 2016;12:154-63.
4. Hoglund K, Fourier A, Perret-Liaudet A, et al. Alzheimer's disease - Recent biomarker developments in relation to updated diagnostic criteria. *Clin Chim Acta* 2015;449:3-8.
5. Padovani A MM, Caltagirone C, Bianchetti A, et al. Raccomandazioni dell'Associazione italiana di psicogeriatrica (AIP) e della Società italiana neurologia delle demenze (SINDEM) sulla diagnosi precoce della malattia di Alzheimer. *Psicogeriatrica* 2015;10:22-9.
6. Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 2009;65:403-13.
7. Sorbi S, Hort J, Erkinjuntti T, et al. EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia. *Eur J Neurol* 2012;19:1159-79.
8. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement* 2012;8:65-73.

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

Marco Lucarelli

Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia e Istituto Pasteur Italia, Fondazione Cenci Bolognetti, Sapienza Università di Roma

ABSTRACT

Next generation genetic studies and personalized therapy: the successful model of Cystic Fibrosis. Cystic Fibrosis (CF) is a complex genetic disease. The causative gene is the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*). Although monogenic, this disease has a complex genotype – phenotype relationship. Several factors originate this complexity. The most important are the high number of *CFTR* mutations, the difficulty of a full mutational analysis, the incomplete knowledge of the functional effect of mutations and their variable outcome, as well as the existence of modifier genes (different from *CFTR*) that modulate the clinical severity. This complexity impairs the diagnostic, prognostic and therapeutic ability. Next generation sequencing approaches represent a revolution in genetic studies, because of their rapidity, low-cost and high-throughput. They allow a near complete mutational characterization of *CFTR* mutated genotypes, with the potentiality of studying several other genes involved in CF clinical modulation. These methods are a perfect precondition for personalized therapeutic approaches of CF. In fact, a full genetic characterization appears to be crucial to applying mutation-specific therapies. Drugs specific for some *CFTR* mutations are already in clinical practice or in phase 3 trials. The enlargement of the CF personalized therapy to an increasing number of mutated genotypes needs a growing knowledge of structural and functional defects of *CFTR*. The synergy between next generation genetic approaches, the enhancement of the comprehension of molecular mechanisms of *CFTR* mutations and the spreading of personalized therapies, are revolutionizing the cure of CF.

INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica [FC; "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) 219700] è la più comune malattia genetica letale della popolazione caucasica. Pur con una grande variabilità geografica, l'incidenza media nella popolazione europea è di ~1/3000, con ~1/27 portatori (1-3). La FC, con genetica autosomica recessiva, è causata da mutazioni del gene "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator" (*CFTR*; 7q31.2; RefSeq NG_016465.4) (4, 5) con un ampio ed eterogeneo spettro di mutazioni e manifestazioni cliniche (3, 6-8). Il gene *CFTR* codifica per una proteina espressa principalmente nella membrana apicale delle cellule epiteliali, con funzione primaria di canale dello ione cloruro (Cl⁻). La proteina CFTR ha anche numerose altre funzioni quali, ad esempio, il trasporto di bicarbonati (HCO₃⁻), la regolazione di altri canali ionici (ad esempio

il canale epiteliale del sodio, Na⁺; ENaC), nonché un ruolo nell'immunità e infiammazione (4, 9, 10). La direzione del movimento del Cl⁻ dipende dal tipo di cellula: secrezione extracellulare nel colon e nelle vie aeree, riassorbimento nella ghiandola sudoripara (9, 10).

L'aspetto patologico più grave origina nel polmone, nel quale il malfunzionamento del *CFTR* origina, contemporaneamente, sia un'anomala secrezione di Cl⁻ che un anomalo riassorbimento del Na⁺ (11-14). Di conseguenza, si produce un alterato movimento delle molecole di acqua che riduce l'idratazione del liquido di superficie delle vie aeree, con produzione di un muco polmonare denso che impedisce una corretta clearance mucociliare (5). Ciò favorisce le infezioni batteriche, spesso multiresistenti, e provoca una forte risposta immunitaria. La catena degli eventi patogenetici continua con l'ostruzione bronchiale, le bronchiectasie, l'atrofia e l'insufficienza respiratoria (5, 15).

Corrispondenza a: Marco Lucarelli, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sapienza Università di Roma, Azienda Policlinico Umberto I, Viale Regina Elena 324, 00161 Roma. Tel. 06-49970458, Fax 06-49970458, E-mail: marco.lucarelli@uniroma1.it

Ricevuto: 05.10.2017

Revisionato: 09.11.2017

Accettato: 05.12.2017

Pubblicato on-line: 19.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.003

Le manifestazioni cliniche e la gravità della FC sono molto variabili. È necessario distinguere la FC vera e propria (chiamata anche forma classica e che in questo articolo verrà indicata semplicemente come FC) dalle patologie correlate al *CFTR* (CFTR-RD, chiamate anche forme non-classiche) (16, 17). La FC è una patologia poli-sintomatica e multiorgano, con insufficienza pancreatica in oltre l'80% dei pazienti e infertilità per azoospermia ostruttiva dovuta ad assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) in quasi tutti i pazienti maschi. Le CFTR-RD sono oligo- o mono-sintomatiche con, al momento, più di dieci diverse entità cliniche (4). Le CFTR-RD più conosciute sono quelle legate all'infertilità (o subfertilità) maschile come, ad esempio, proprio la CBAVD (7, 8, 18). Infatti, questa patologia può manifestarsi anche come CFTR-RD mono-sintomatica, oltre che come una delle manifestazioni cliniche della FC. Altri difetti della riproduzione maschile sono stati proposti come CFTR-RD quali, ad esempio, l'azoospermia non-ostruttiva, i difetti della spermatogenesi (19-25) e l'iperviscosità idiopatica del liquido seminale (26, 27). Per questi difetti, ulteriori studi sono necessari prima di arrivare a conclusioni definitive. Tuttavia è probabile che, in almeno una parte dei pazienti con queste patologie, le mutazioni del *CFTR* possano avere un ruolo patogenetico. Altre entità cliniche individuate come CFTR-RD sono le pancreatiti idiopatiche e le bronchiectasie disseminate (8).

La diagnosi di FC si effettua a partire dall'analisi della concentrazione di Cl⁻ nel sudore (il cosiddetto test del sudore) (28) e dalla valutazione clinica. L'analisi genetica del *CFTR* è utilizzata per confermare la diagnosi di malattia come da linee guida e raccomandazioni (16, 17). Tuttavia, sia la diagnosi sia la terapia sono complesse.

IL RAPPORTO TRA GENOTIPO E FENOTIPO

Il gene *CFTR* è lungo ~250 kb ed è composto di 27 esoni. Il trascritto principale è di 6132 basi, la proteina funzionale è di 1480 aminoacidi (database Ensembl <http://www.ensembl.org/index.html>). La malattia origina quando entrambi gli alleli sono mutati, in omozigosi (se la mutazione è la stessa su entrambi gli alleli) oppure in eterozigosi composta (se le mutazioni sui due alleli sono diverse). Il portatore di una mutazione su un solo allele non è malato e non ha sintomi clinici. Due portatori hanno un rischio di 1/4 (25%) di generare un figlio affetto. La genetica della FC, poiché malattia monogenica recessiva, dovrebbe essere semplice. Al contrario, numerose variabili biochimiche e genetiche la complicano. Conseguentemente, il rapporto tra il genotipo del *CFTR* (le mutazioni) e il fenotipo della FC (le manifestazioni cliniche) è particolarmente complesso (29, 30). Studi recenti hanno evidenziato che un'attenta analisi dei genotipi mutati può consentire di individuare una generale relazione tra il genotipo e alcune macro-categorie cliniche di FC e CFTR-RD (7). Dal punto di vista degli effetti delle mutazioni, è generalmente

accettato che il tipo e la gravità delle manifestazioni cliniche dipendano dalla funzionalità residua della proteina CFTR (31, 32). Tuttavia, a causa della nostra ancora incompleta comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nella produzione e maturazione di una proteina CFTR funzionante, il modello generale che lega la funzionalità residua alle manifestazioni cliniche non può essere facilmente utilizzato in pratica. Ciò riduce l'efficacia diagnostica, prognostica e terapeutica. Di seguito sono brevemente descritte le principali cause di variabilità che influenzano il rapporto tra genotipo e fenotipo.

L'elevato numero di mutazioni, e l'ancor più elevato numero di loro combinazioni, è una delle fonti di variabilità. Al momento sono note 2023 variazioni di sequenza del *CFTR* (database CFTR1 database <http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>). Inoltre, nonostante grandi sforzi volti alla caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza del *CFTR* (database CFTR2 database <http://cftr2.net/>), solo per poche di esse si è giunti all'assegnazione di un chiaro ruolo patogenetico (7, 33-35). Un'altra fonte di variabilità è la possibilità di combinazione delle mutazioni del *CFTR* oltre che in *trans* (su alleli diversi) anche in *cis* (sullo stesso allele) a formare i cosiddetti alleli complessi. Sebbene sia un aspetto non ancora studiato in maniera sistematica, ci sono evidenze sperimentali che questo tipo di alleli potrebbero essere abbastanza frequenti con potenziali ricadute sulle manifestazioni cliniche della malattia (4, 36, 37). Molti degli approcci di ricerca mutazionale utilizzati attualmente non sono particolarmente adatti a rivelare gli alleli complessi. Di conseguenza, molti pazienti che hanno manifestazioni cliniche di diversa gravità, con apparentemente stesso genotipo mutato, potrebbero in realtà avere mutazioni aggiuntive non individuate che giustificerebbero le differenti manifestazioni cliniche. È stato addirittura dimostrato che alcuni polimorfismi del *CFTR*, che isolati non causano patologia, se combinati in specifici aplotipi possono avere conseguenze cliniche, sebbene lievi (38, 39). Ulteriore complessità è aggiunta dai meccanismi molecolari e cellulari che operano nel percorso dal gene alla proteina matura localizzata in membrana. La trascrizione del *CFTR* è tessuto-specifica e strettamente controllata dal punto di vista temporale (10). Gli elementi di regolazione non sono limitati al promotore ma si estendono a tutto il locus *CFTR* (40-44), che comprende ~500 kb. È stato dimostrato che anche i micro RNA (miRNA) contribuiscono ai livelli finali del RNA messaggero (mRNA) del *CFTR* (45-49). La proteina CFTR subisce complessi processi di trasporto e maturazione, apertura e chiusura del canale, endocitosi e riciclo, interazione con molte altre proteine di membrana e, in ultimo, degradazione nei lisosomi (10, 50, 51). Numerose evidenze sperimentali hanno inoltre evidenziato il ruolo di modulazione degli effetti diretti del *CFTR* da parte di altri geni chiamati geni modificatori (8, 30, 52-57) e/o dell'interattoma del *CFTR* (58). Lo studio attualmente più recente e completo è quello dell'International Cystic Fibrosis Gene Modifier

Consortium (59), che ha studiato più di 8 milioni di varianti in 6365 pazienti FC mediante 2 studi "genome-wide association studies" (GWAS). In questo modo sono stati trovati 5 loci modificatori strettamente associati alla gravità clinica della FC. C'è inoltre da considerare che le concentrazioni fisiologiche di proteina CFTR sono tessuto-specifiche e che, quindi, a parità di livello funzionale di *CFTR*, possono essere colpiti solo alcuni organi. Naturalmente non mancano gli effetti della variabilità casuale e dell'ambiente.

MUTAZIONI, CLASSI MUTAZIONALI E TEST GENETICI IN USO FINORA

Un notevole risultato della genetica molecolare della FC è stato quello di individuare 6 classi funzionali di mutazioni (8, 60) e di assegnare almeno una parte delle variazioni del *CFTR* a una classe specifica. Nella classe I (difetti di sintesi) sono raggruppate quelle mutazioni che producono una perdita completa della produzione della proteina. In classe II (difetti di maturazione e trasporto) sono raggruppate quelle mutazioni che incrementano la degradazione della proteina (con difetti di ripiegamento) nel reticolo endoplasmatico e, conseguentemente, ne diminuiscono la localizzazione in membrana. In classe III (difetti di regolazione o di apertura) sono incluse quelle mutazioni che inducono una diminuita capacità di conduzione ionica del canale a causa di una difettosa regolazione. In classe IV (difetti di conduzione) sono raggruppate quelle mutazioni che producono un analogo difetto di trasporto del Cl⁻, dovuto però in questo caso ad anomalie strutturali del canale. In classe V (ridotta sintesi) sono raggruppate quelle mutazioni che, con vari meccanismi molecolari, riducono la quantità dell'mRNA "wild type" del *CFTR*. In classe VI (diminuita stabilità) sono raggruppate le mutazioni che diminuiscono la stabilità della proteina CFTR in membrana e anche quelle che inducono una difettosa interazione del *CFTR* con altre proteine. Tuttavia, spesso, una mutazione può originare più di un difetto biochimico e, di conseguenza, può essere classificata in diverse classi mutazionali.

La complessità genetica della FC ha reso difficile la definizione di strategie di ricerca mutazionale univoche. Si è reso evidente che non può essere utilizzato un unico test genetico che sia utile sia nei diversi approcci diagnostici (ad es., per FC, CFTR-RD o screening neonatale), che alla ricerca del portatore nella popolazione generale (61-63). Un'importante caratteristica che deve essere tenuta in considerazione quando si applica un test di ricerca mutazionale è la cosiddetta "detection rate" (DR), cioè la proporzione di alleli mutati rilevabili dal test genetico applicato. La DR è l'equivalente in genetica della sensibilità diagnostica in biochimica clinica. A scopo diagnostico è di solito utilizzato un approccio a più livelli (7, 63). Il primo livello prevede l'utilizzo di un pannello di mutazioni note, sicuramente patogenetiche, ben caratterizzate dal punto di vista molecolare e con una DR sufficientemente elevata (di solito ~85%). Tuttavia, in dipendenza dalla

zona geografica d'origine e dalla particolare forma clinica di FC o CFTR-RD, la DR può variare molto. Conseguentemente, dopo il test di primo livello, può non essere stato individuato un numero variabile di alleli mutati (i cosiddetti alleli "unknown"). In questi casi, è applicato un secondo livello d'indagine per sequenziamento di tutti gli esoni, zone introniche adiacenti e promotore prossimale del *CFTR* (64-66). In questo modo, la DR del test è notevolmente aumentata (raggiungendo ~97%). Tuttavia, alcuni tipi particolari di mutazioni sfuggono anche al sequenziamento; ad esempio, le mutazioni pienamente introniche e le macro-delezioni o macro-duplicazioni. Di conseguenza, può essere applicato un terzo livello d'indagine (con ~2% aggiuntivo di DR) con metodi appropriati alla ricerca di queste particolari alterazioni genetiche. Solo in una piccola parte dei casi è necessario ricorrere, per il completamento diagnostico, all'analisi dell'RNA (per evidenziare, ad esempio, "splicing" anomali originati da mutazioni pienamente introniche) come quarto livello d'indagine (67). Un comune limite di quest'usuale approccio d'indagine genetica è che la ricerca mutazionale viene interrotta al ritrovamento delle prime 2 mutazioni (su due alleli diversi). Ciò può rappresentare una limitazione nell'accuratezza della genotipizzazione (intesa nel senso laboratoristico del termine d'individuazione del reale genotipo mutato) con mancata individuazione di eventuali alleli complessi. Inoltre, dovrebbe essere evidente che l'approccio di ricerca mutazionale a più livelli è inappropriato per la ricerca del portatore. In questo caso, dovrebbe essere applicato solo il test di primo livello, con un pannello mutazionale ottimizzato in base all'origine etnica del probando e alla forma clinica di FC. Infatti, anche nella FC, sono state evidenziate eterogeneità nel pattern mutazionale quali, ad esempio, quelle tra forme con pancreas-insufficienza e pancreas-sufficienza (63).

I TEST GENETICI DI NUOVA GENERAZIONE

I test genetici di nuova generazione, anche chiamati sequenziamento di nuova generazione ("next generation sequencing", NGS) stanno rivoluzionando la ricerca mutazionale nel *CFTR* (68-73). Sono approcci definiti di "targeted resequencing", cioè mirati al sequenziamento di nuova generazione del gene *CFTR*, con lo scopo di evidenziare variazioni di sequenza eventualmente patogenetiche. Questi test hanno reso realizzabile il sequenziamento (test di II livello) di un enorme numero di diverse zone del DNA, contemporaneamente, rapidamente e a basso costo, rendendo i test genetici realmente ad elevata produttività e automazione, con enormi ricadute pratiche. E' diventato possibile analizzare zone del *CFTR* precedentemente non studiate a scopo diagnostico come, ad esempio, l'intera zona "5'-flanking", tutto il 3'-UTR ("untranslated region"), le zone pienamente introniche nonché l'intero locus del *CFTR*. Ciò probabilmente svelerà un ad oggi insospettato numero di alleli complessi. Inoltre, anche l'analisi dei geni modificatori e dell'interattoma del *CFTR*

sta diventando realmente possibile, permettendo a breve un miglioramento della comprensione delle cause di variabilità intra- e extra-*CFTR* nella FC. Dal punto di vista tecnico, il numero di passaggi richiesti per una piena caratterizzazione mutazionale del *CFTR* si è notevolmente ridotto ed essi vengono generalmente eseguiti su singole piattaforme analitiche di NGS. Alcune di esse permettono la contemporanea analisi sia di piccole mutazioni sia di macro-delezioni e macro-duplicazioni, combinando in un singolo passaggio diversi livelli d'indagine. Quest'approccio di ricerca massiva di variazioni di sequenza del DNA, rende ancora più critica la problematica della loro caratterizzazione funzionale. Al momento, la capacità dei test genetici in NGS supera di gran lunga la capacità di interpretazione clinica delle variazioni di sequenza trovate. Un problema destinato ad aumentare, tanto più saranno individuati alleli complessi e aplotipi del *CFTR*, ma anche variazioni di sequenza nell'intero locus *CFTR* nonché nei geni modificatori e dell'interattoma.

Sebbene gli alleli complessi siano al momento poco studiati dal punto di vista funzionale, esistono svariate evidenze sperimentali del loro effetto sul fenotipo clinico finale (4, 36, 37, 74). Alcune evidenze esistono anche relativamente alle variazioni di sequenza nei geni modificatori e dell'interattoma del *CFTR* che possano avere influenza sul fenotipo clinico (8, 59). Invece, quasi non esistono evidenze sperimentali relative a variazioni di sequenza nel locus *CFTR* che, mediante eventuali interazioni a lungo raggio, possano alterarne il funzionamento. A causa di queste limitazioni interpretative, è molto probabile che la ricerca mutazionale mediante pannelli di mutazioni sicuramente causa di malattia continuerà ad essere utilizzata. Anche in questo caso, gli approcci in NGS possono essere enormemente utili, consentendo l'uso di pannelli mutazionali estremamente ampi. Nei pannelli in NGS è al momento possibile includere centinaia di mutazioni del gene *CFTR* (alleli complessi inclusi). Grazie al progressivo incremento del numero delle mutazioni incluse nei pannelli in NGS, il divario al momento esistente tra le DR che lo stesso pannello mutazionale ha in diverse forme cliniche di FC e *CFTR*-RD (63) è destinato a diminuire. Tuttavia, esistendo mutazioni rare, spesso individuali (7), e persistendo un'elevata eterogeneità geografica, rimane improbabile che possa essere definito un unico pannello mutazionale, per quanto ampio, che sia adatto a tutte le etnie e a tutte le forme cliniche di FC e *CFTR*-RD.

LA TERAPIA PERSONALIZZATA

La disponibilità di una metodologia potenzialmente in grado di individuare tutte le lesioni molecolari rilevanti per la FC e le *CFTR*-RD è perfettamente complementare alla cosiddetta medicina P4: personalizzata, predittiva, preventiva e partecipativa (75, 76). Un secondo aspetto rivoluzionario (dopo le metodologie in NGS) che sta completamente cambiando gli approcci terapeutici, è la dimostrazione della reale fattibilità della terapia

personalizzata della FC. Al momento, in FC, il termine terapia personalizzata significa quasi esclusivamente la correzione degli effetti di alcune mutazioni (appartenenti a categorie funzionali specifiche) del gene *CFTR* mediante piccole molecole che intervengono sul difetto biochimico della proteina. Quindi, il lavoro di categorizzazione funzionale delle mutazioni del *CFTR*, dipendente dal loro effetto biochimico, non è più un mero approccio teorico, ma si rivela un passaggio fondamentale per lo sviluppo di terapie efficaci e mirate (77). Nella linea di ricerca mirata allo sviluppo di nuovi farmaci per la FC della Fondazione statunitense (<https://www.cff.org/Trials/Pipeline>) sono al momento presenti 19 trattamenti volti al ripristino della funzione del *CFTR*, basati sull'effetto biochimico delle mutazioni. Due di questi trattamenti mutazione-specifici sono già disponibili per i pazienti, anche in Italia. Il primo farmaco è l'lvacaftor (anche noto come VX-770 o Kalydeco) che è un potenziatore. Una sostanza, cioè, che facilita l'apertura del canale *CFTR* difettivo presente in membrana, consentendo un corretto passaggio di Cl⁻. Questo farmaco funziona sulle cosiddette mutazioni di "gating" (cioè quelle che impediscono la corretta regolazione dell'apertura del canale) ed è stato approvato, nel dicembre 2014, per il trattamento di pazienti FC con almeno una di 9 specifiche mutazioni appartenenti a questa categoria funzionale. Il secondo farmaco è l'Orkambi, introdotto a luglio del 2015, che consiste in una terapia combinata con un correttore (il Lumacaftor, anche noto come VX-809) e un potenziatore (anche in questo caso l'lvacaftor). Il correttore è una sostanza che facilita la maturazione e il trasporto della proteina *CFTR* difettiva in membrana, dove il potenziatore faciliterà a sua volta l'apertura del canale. Questa terapia combinata funziona anche su quelle mutazioni che inducono difetti di maturazione della proteina *CFTR* come, ad esempio, la mutazione F508del (quella più frequente in FC). In aggiunta a queste sostanze, già approvate per uso clinico, c'è un altro trattamento in studi clinici di fase 3: la terapia combinata con Tezacaftor (anche noto come VX-661) e l'lvacaftor (rispettivamente, un correttore e un potenziatore). Altre 8 sostanze/trattamenti sono in studi clinici di fase 2 e altre 3 in studi di fase 1. Infine, 5 sostanze sono incluse in studi preclinici. Quindi, la terapia personalizzata della FC è già efficace per alcune mutazioni specifiche ma è alle porte per un più ampio numero di esse (78-82).

Gli approcci genetici in NGS facilitano grandemente la ricerca mutazionale, incrementandone notevolmente la produttività. L'analisi più agevole di un maggior numero di campioni e, soprattutto, di un maggior numero di zone del *CFTR* sta aumentando la capacità di riconoscimento anche di lesioni molecolari multiple che concorrono alle manifestazioni cliniche finali. E' evidente che un genotipo inaccurato (nel quale cioè non sono state individuate tutte le mutazioni) può alterare la risposta alla terapia mutazione-specifica, con uno svantaggio anche economico. Tuttavia, nonostante la straordinaria produttività dei nuovi approcci genetici, permarrà per qualche tempo l'ostacolo della

caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza trovate. Il punto critico della genetica molecolare in generale, inclusa quella relativa alla FC è, e sarà sempre di più, la definizione dell'eventuale significato patogenetico delle variazioni di sequenza trovate, incluse le varianti più rare (83). Senza una piena comprensione del meccanismo biochimico di azione di ciascuna mutazione, o almeno l'assegnazione di esse a una specifica classe funzionale, una terapia personalizzata sarebbe impraticabile. Inoltre, anche la possibilità di difetti biochimici multipli a carico di una singola mutazione deve essere tenuta in debita considerazione. Una migliore conoscenza della genetica del *CFTR* raggiunta grazie agli approcci in NGS permetterà di applicare una medicina predittiva in grado di delineare la possibile evoluzione della malattia, nonché una medicina preventiva in grado di somministrare la terapia personalizzata abbastanza precocemente in modo da ridurre al minimo, o addirittura eliminare, le manifestazioni cliniche. L'attuale trattamento personalizzato della FC, efficace sulla proteina CFTR, è caratterizzato dal fatto che ciascuna sostanza è efficace solo su un limitato numero di mutazioni, generalmente appartenenti alla stessa classe mutazionale, altamente caratterizzate dal punto di vista biochimico e molecolare. L'efficacia di queste sostanze non è limitata al polmone e può correggere anche i difetti multi-organo. Tuttavia, è necessario il continuo mantenimento di un'adeguata concentrazione nell'organismo, e quindi una somministrazione costante, anche se i livelli fisiologici di funzionalità del *CFTR* non vengono generalmente ripristinati.

Il miglioramento della terapia classica, basata sul trattamento dei sintomi, unito all'istituzione di Centri di Riferimento distribuiti sul territorio e equipe sanitarie multidisciplinari, hanno prodotto un incremento della mediana di sopravvivenza dei pazienti con FC da pochi anni (se non mesi) negli anni '30 ai ~20 anni nei primi anni 2000, fino ai previsti 40 anni per i nati e diagnosticati nel 2010 (Registro FC USA, Annual Data Report 2010, www.cff.org). Un ulteriore sorprendente innalzamento dell'aspettativa di vita è atteso grazie alla terapia personalizzata.

CONCLUSIONI

La genetica della FC è più complessa di quanto ci si possa aspettare. La ricerca mutazionale in NGS costituisce un approccio con una produttività senza precedenti che sta rivoluzionando l'area dei test genetici. Nei prossimi anni ci si può aspettare un significativo avanzamento delle conoscenze relative agli aspetti strutturali del gene e dell'intero locus *CFTR*, alle loro variazioni di sequenza in *cis* e in *trans*, nonché alle interazioni di lungo raggio nel locus. E' stato dimostrato che queste ultime interazioni, tra zone cromatiniche anche distanti tra loro e dal *CFTR*, mediate da proteine leganti il DNA possono modulare la trascrizione del *CFTR* e, quindi, la quantità finale di proteina funzionante. Saranno anche necessari studi di conferma che possano

definitivamente individuare i reali geni modificatori della FC, il loro ruolo specifico nella modulazione degli aspetti clinici e le loro variazioni di sequenza che possano eventualmente alterare il coordinamento dell'interattoma del *CFTR*. Tutti questi aspetti miglioreranno la comprensione del rapporto tra genotipo e fenotipo nella FC. La terapia personalizzata della FC, volta alla correzione di specifici difetti biochimici della proteina CFTR originati da specifiche mutazioni del gene, è già una realtà per alcune mutazioni. Per una sua più ampia applicazione è indispensabile intensificare gli sforzi di caratterizzazione e classificazione funzionale a livello biochimico, cellulare e clinico, delle mutazioni del *CFTR*. L'area della caratterizzazione funzionale delle mutazioni del gene e del locus *CFTR* sarà probabilmente quella nella quale si concentreranno i maggiori sforzi nell'immediato futuro. La sinergia tra le due più grandi novità in FC, come anche in altre malattie genetiche, cioè gli approcci genetici in NGS e la terapia personalizzata, produrranno vantaggi senza precedenti per i pazienti.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373:1891-904.
2. Salvatore D, Buzzetti R, Baldo E, et al. An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea. *J Cyst Fibros* 2011;10:71-85.
3. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002;19:575-606.
4. Lucarelli M, Pierandrei S, Bruno SM, et al. The genetics of CFTR: genotype - phenotype relationship, diagnostic challenge and therapeutic implications. In: Sriramulu D, ed. Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research. Rijeka: Intech - Open access company, 2012:91-122.
5. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet* 2016;388:2519-31.
6. Casals T, Bassas L, Egozcue S, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 2000;15:1476-83.
7. Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, et al. A genotypic-oriented view of CFTR genetics highlights specific mutational patterns underlying clinical macrocategories of cystic fibrosis. *Mol Med* 2015;21:257-75.
8. Bombieri C, Seia M, Castellani C. Genotypes and phenotypes in cystic fibrosis and cystic fibrosis transmembrane regulator-related disorders. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36:180-93.
9. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008;77:701-26.
10. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002;1:13-29.

11. Berdiev BK, Qadri YJ, Benos DJ. Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst* 2009;5:123-7.
12. Mall M, Bleich M, Greger R, et al. The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest* 1998;102:15-21.
13. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995;269:847-50.
14. Gentzsch M, Dang H, Dang Y, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 2010;285:32227-32.
15. Harun SN, Wainwright C, Klein K, et al. A systematic review of studies examining the rate of lung function decline in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2016;20:55-66.
16. Bombieri C, Claustres M, De BK, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10(Suppl. 2):S86-102.
17. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17:51-65.
18. Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2005;10:14-41.
19. Chen H, Ruan YC, Xu WM, et al. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update* 2012;18:703-13.
20. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002;17:13-6.
21. Jiang LY, Shan JJ, Tong XM, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is correlated closely with sperm progressive motility and normal morphology in healthy and fertile men with normal sperm parameters. *Andrologia* 2014;46:824-30.
22. Li CY, Jiang LY, Chen WY, et al. CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Hum Reprod* 2010;25:317-27.
23. Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, et al. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertil Steril* 2006;85:135-8.
24. Tomaiuolo R, Fausto M, Elce A, et al. Enhanced frequency of CFTR gene variants in couples who are candidates for assisted reproductive technology treatment. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1289-93.
25. Yu J, Chen Z, Zhang T, et al. Association of genetic variants in CFTR gene, IVS8 c.1210-12T[5_9] and c.1210-35_1210-12GT[8_12], with spermatogenetic failure: case-control study and meta-analysis. *Mol Hum Reprod* 2011;17:594-603.
26. Elia J, Delfino M, Imbrogno N, et al. Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. *Asian J Androl* 2009;11:609-15.
27. Rossi T, Grandoni F, Mazzilli F, et al. High frequency of (TG)_mTn variant tracts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in men with high semen viscosity. *Fertil Steril* 2004;82:1316-22.
28. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545-9.
29. Brennan ML, Schrijver I. Cystic fibrosis: a review of associated phenotypes, use of molecular diagnostic approaches, genetic characteristics, progress, and dilemmas. *J Mol Diagn* 2016;18:3-14.
30. Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a009548.
31. Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nat Genet* 1996;12:348-50.
32. Zhang L, Button B, Gabriel SE, et al. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol* 2009;7:e1000155.
33. Sosnay PR, Siklosi KR, Van GF, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 2013;45:1160-7.
34. Terlizzi V, Carnovale V, Castaldo G, et al. Clinical expression of patients with the D1152H CFTR mutation. *J Cyst Fibros* 2015;14:447-52.
35. Schippa S, Iebba V, Santangelo F, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) allelic variants relate to shifts in faecal microbiota of cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 2013;8:e61176.
36. Lucarelli M. A commentary on the novel complex allele [A238V;F508del] of the CFTR gene: clinical phenotype and possible implications for cystic fibrosis etiological therapies. *J Hum Genet* 2016;61:471-2.
37. Lucarelli M, Narzi L, Pierandrei S, et al. A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation. *Genet Med* 2010;12:548-55.
38. Steiner B, Truninger K, Sanz J, et al. The role of common single-nucleotide polymorphisms on exon 9 and exon 12 skipping in nonmutated CFTR alleles. *Hum Mutat* 2004;24:120-9.
39. Steiner B, Rosendahl J, Witt H, et al. Common CFTR haplotypes and susceptibility to chronic pancreatitis and congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Mutat* 2011;32:912-20.
40. Blackledge NP, Carter EJ, Evans JR, et al. CTCF mediates insulator function at the CFTR locus. *Biochem J* 2007;408:267-75.
41. Blackledge NP, Ott CJ, Gillen AE, et al. An insulator element 3' to the CFTR gene binds CTCF and reveals an active chromatin hub in primary cells. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1086-94.
42. Moisan S, Berlivet S, Ka C, et al. Analysis of long-range interactions in primary human cells identifies cooperative CFTR regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 2015;44:2564-76.
43. Ott CJ, Blackledge NP, Leir SH, et al. Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene. *Biochem Soc Trans* 2009;37:843-8.
44. Ott CJ, Blackledge NP, Kerschner JL, et al. Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19934-9.
45. Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, et al. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:13362-7.
46. Amato F, Seia M, Giordano S, et al. Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PLoS ONE* 2013;8:e60448.
47. Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, et al. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2015;45:116-28.
48. Sonnevile F, Ruffin M, Guillot L, et al. New insights about

- miRNAs in cystic fibrosis. *Am J Pathol* 2015;185:897-908.
49. McKiernan PJ, Greene CM. MicroRNA dysregulation in cystic fibrosis. *Mediators Inflamm* 2015;2015:529642.
 50. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* 2011;139:1480-90.
 51. Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 2006;440:477-83.
 52. Furlan LL, Marson FA, Ribeiro JD, et al. IL8 gene as modifier of cystic fibrosis: unraveling the factors which influence clinical variability. *Hum Genet* 2016;135:881-94.
 53. Stanke F. The contribution of the airway epithelial cell to host defense. *Mediators Inflamm* 2015;2015:463016.
 54. Guillot L, Beucher J, Tabary O, et al. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;52:83-93.
 55. Weiler CA, Drumm ML. Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. *Front Pharmacol* 2013;4:40.
 56. Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1214:57-69.
 57. Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2012;7:267-82.
 58. Wang X, Venable J, LaPointe P, et al. Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 2006;127:803-15.
 59. Corvol H, Blackman SM, Boelle PY, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 2015;6:8382.
 60. Becq F, Mall MA, Sheppard DN, et al. Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J Cyst Fibros* 2011;10(Suppl 2):S129-S45.
 61. Narzi L, Ferraguti G, Stamato A, et al. Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up. *Clin Genet* 2007;72:39-46.
 62. Narzi L, Lucarelli M, Lelli A, et al. Comparison of two different protocols of neonatal screening for cystic fibrosis. *Clin Genet* 2002;62:245-9.
 63. Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, et al. The impact on genetic testing of mutational patterns of CFTR gene in different clinical macrocategories of cystic fibrosis. *J Mol Diagn* 2016;18:554-65.
 64. Ferraguti G, Pierandrei S, Bruno SM, et al. A template for mutational data analysis of the CFTR gene. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1447-51.
 65. Lucarelli M, Narzi L, Piergentili R, et al. A 96-well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene. *Anal Biochem* 2006;353:226-35.
 66. Lucarelli M, Grandoni F, Rossi T, et al. Simultaneous cycle sequencing assessment of (TG)_n and T_n tract length in CFTR gene. *Biotechniques* 2002;32:540-7.
 67. Felicio V, Ramalho AS, Igreja S, et al. mRNA-based detection of rare CFTR mutations improves genetic diagnosis of cystic fibrosis in populations with high genetic heterogeneity. *Clin Genet* 2017;91:476-81.
 68. Lefterova MI, Shen P, Odegaard JI, et al. Next-generation molecular testing of newborn dried blood spots for cystic fibrosis. *J Mol Diagn* 2016;18:267-82.
 69. Trujillano D, Weiss ME, Koster J, et al. Validation of a semiconductor next-generation sequencing assay for the clinical genetic screening of CFTR. *Mol Genet Genomic Med* 2015;3:396-403.
 70. Abou Tayoun AN, Tunkey CD, Pugh TJ, et al. A comprehensive assay for CFTR mutational analysis using next-generation sequencing. *Clin Chem* 2013;59:1481-8.
 71. Goldstein DB, Allen A, Keebler J et al. Sequencing studies in human genetics: design and interpretation. *Nat Rev Genet* 2013;14:460-70.
 72. Lucarelli M, Porcaro L, Biffignandi A, et al. A new targeted cfr mutation panel based on next-generation sequencing technology. *J Mol Diagn* 2017;19:788-800.
 73. Straniero L, Solda G, Costantino L, et al. Whole-gene CFTR sequencing combined with digital RT-PCR improves genetic diagnosis of cystic fibrosis. *J Hum Genet* 2016;61:977-84.
 74. Terlizzi V, Castaldo G, Salvatore D, et al. Genotype-phenotype correlation and functional studies in patients with cystic fibrosis bearing CFTR complex alleles. *J Med Genet* 2017;54:224-35.
 75. Corvol H, Thompson KE, Tabary O, et al. Translating the genetics of cystic fibrosis to personalized medicine. *Transl Res* 2016;168:40-9.
 76. Weston AD, Hood L. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res* 2004;3:179-96.
 77. Amaral MD, Kunzelmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:334-41.
 78. Hoffman LR, Ramsey BW. Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest* 2013;143:207-13.
 79. Boinot C, Jollivet SM, Ferru-Clement R, et al. Searching for combinations of small-molecule correctors to restore f508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and processing. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;350:624-34.
 80. Lane MA, Doe SJ. A new era in the treatment of cystic fibrosis. *Clin Med* 2014;14:76-8.
 81. Whiting P, Al M, Burgers L, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 2014;18:1-106.
 82. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015;373:220-31.
 83. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 2015;16:45-56.

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

Antonio D'Avolio¹, Marco Cantù², Jacopo Gervasoni³, Carlo Artusi⁴, Mariela Marinova⁴, Antonello Nonnato⁵, Giuliana Cangemi⁶, Silvia Persichilli³ per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche"

¹Laboratorio di Farmacologia Clinica e di Farmacogenetica, Ospedale Amedeo di Savoia, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

²Laboratorio di Biochimica e Farmacologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio EOLAB, Ente Ospedaliero Cantonale, Bellinzona, Svizzera

³UOC Chimica Clinica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

⁴Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Padova

⁵Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Città della Salute e della Scienza", Torino

⁶Laboratorio di Patologia Clinica, Istituto Giannina Gaslini, Genova

ABSTRACT

Bioanalytical method validation of quantitative mass spectrometry based assay: experimental protocols and regulations. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technique has rapidly extended the spectrum of clinical chemistry methods during the past decade and it has become a standard tool for endogenous and exogenous substances in research laboratories as well as in many clinical laboratories. To date, many guidelines for bioanalytical method validation have been published, but there is still the need to have specific guidelines and experimental protocols. In particular, we need to further focus and investigate the overall clinical aspects of spectrometry method validation, for both exogenous and endogenous molecules. The aim of the present document is to suggest specific experimental regulations and protocols for bioanalytical LC-MS method validation for exogenous and endogenous molecules, inspired by actual international guidelines and integrated with practical tips to obtain better performance on methods used in routine clinical practice. Here we have introduced new concepts such as "normalized matrix effect", and protocols for method validation using "pathological samples" and "altered samples", as these are the most commonly samples encountered in laboratory routine. In conclusion, the new rules and protocols reported in this work do not intend to replace international guidelines; we believe that these rules have to be considered besides the available guidelines with the aim to help the LC-MS users by recommending a number of experimental steps to be performed during each method/kit validation.

INTRODUZIONE

Nell'ultima decade la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (LC-MS) e maggiormente la spettrometria di massa accoppiata (LC-MS/MS, in seguito denominata come LC-MS) ha rapidamente esteso lo spettro dei metodi impiegati nelle indagini di chimica clinica ed è diventata uno strumento di riferimento per la quantificazione delle sostanze endogene ed esogene nei laboratori di ricerca così come

in molti laboratori clinici.

Sebbene la LC-MS abbia caratteristiche tali da suggerire un'alta accuratezza analitica, sono state recentemente identificate potenziali fonti di inaccuratezza e di bias (1). Queste possono essere correlate ad esempio al processo di ionizzazione nella sorgente con trasformazione di metaboliti coniugati in analiti oggetto della quantificazione, oppure possono essere attribuite ad effetti matrice che producono processi di ionizzazione diversi tra gli analiti di interesse

Corrispondenza a: Antonio D'Avolio, Laboratorio di Farmacologia Clinica e di Farmacogenetica, Dipartimento di Scienze Mediche, Ospedale Amedeo di Savoia, Corso Svizzera 164, 10149 Torino. Tel. 0114393841, Fax 0114393996, E-mail: antonio.davolio@unito.it

Ricevuto: 06.09.2017

Revisionato: 07.11.2017

Accettato: 17.11.2017

Pubblicato on-line: 19.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.004

e gli standard interni (IS) (1). Il diverso effetto della ionizzazione delle molecole da quantificare rispetto allo IS può essere così marcato da rendere inaccurato il dato quantitativo e deve essere attentamente valutato soprattutto nel caso dell'impiego di standard interni non isotopicamente modificati. Inoltre l'inaccuratezza può essere associata anche con il processo di selezione degli ioni target di quantificazione nel caso in cui nella matrice vi siano delle molecole, diverse da quelle da quantificare, che frammentano nello stesso modo degli ioni target. Nella maggior parte dei casi la maggior fonte di inaccuratezza può essere eliminata e/o controllata da una purificazione del campione biologico, ad esempio mediante estrazione in fase solida, e da uno studio puntuale e attento, ottimizzando le condizioni separative cromatografiche.

La preparazione dei campioni, la scelta della separazione cromatografica ottimale e quindi la scelta della colonna cromatografica, delle condizioni di flusso, di gradiente oltre a tutti i parametri richiesti dalle linee guida internazionali (2-5), sono punti critici nel processo di validazione di un metodo bioanalitico in LC-MS, specialmente quando è utilizzato in una routine clinica. Il recente dibattito sull'inaccuratezza dei risultati della 25-OH-vitamina D ottenuti con LC-MS, ha messo in evidenza il bisogno di una maggiore standardizzazione dei metodi anche in spettrometria di massa per ottenere un risultato di qualità soddisfacente per l'uso clinico dei risultati. La garanzia di qualità è un traguardo imprescindibile per qualsiasi applicazione analitica e soprattutto nell'applicazione clinica dei metodi LC-MS sviluppati in casa dove è richiesta una validazione completa; ciò anche alla luce della nuova regolamentazione (6) e del fatto che non sono molti i kit LC-MS diagnostici *in vitro* (IVD) presenti sul mercato.

Ad oggi, sono state pubblicate numerose linee guida per la validazione dei metodi bioanalitici ma c'è ancora la necessità di avere specifiche linee guida e protocolli sperimentali per le metodiche di LC-MS, soprattutto sullo studio dell'effetto matrice, e sull'impatto dei campioni patologici sulle caratteristiche di qualità del metodo (come ad esempio campioni lipemici, iperbilirubinemici). In particolare, è necessario indagare ulteriormente sull'aspetto clinico della validazione del metodo LC-MS, sia per le molecole esogene che endogene; pertanto, ogni metodo dovrebbe essere sottoposto a una rigorosa e sistematica validazione clinica al fine di garantire risultati e cure efficaci ai pazienti.

Il presente documento trae origine dalle considerazioni contenute nelle linee guida internazionali (2-5) e amplia il percorso di validazione con la valutazione dell'effetto matrice normalizzato (7). Inoltre lo scopo del documento del gruppo di studio di SIBioC è quello di suggerire delle regole e un protocollo di validazione dei metodi bioanalitici in LC-MS [riferibili in particolare alle linee guida Food and Drug Administration (FDA) ed European Medicines Agency (EMA)] applicabili per la quantificazione di componenti sia endogeni che esogeni, studiando l'effetto matrice in campioni patologici e in campioni alterati.

VALIDAZIONE DEL METODO BIOANALITICO

Validazione completa

Come indicato nelle linee guida, ogni metodo analitico, sia nuovo o basato sulla letteratura (2-5) deve essere validato completamente, in particolar modo per metodi usati nella pratica clinica (1). Lo scopo della validazione è quello di dimostrare l'affidabilità di un metodo nella determinazione della concentrazione di un analita (o di più analiti) in una matrice biologica specifica, come il sangue, il plasma, il siero, le urine, il fluido cerebrospinale o la saliva, considerando anche i nuovi sistemi di campionamento quali quelli su carta o filtro, come i "dried blood spots" (DBS) e i "dried plasma spots" (DPS) (3, 8-12). Inoltre, se i campioni vengono raccolti con un anticoagulante, la validazione deve essere effettuata usando lo stesso anticoagulante presente nei campioni dello studio. Generalmente, una validazione completa dovrebbe essere effettuata per ciascun tipo di specie e di matrice considerate (2).

Tutti i passaggi necessari per una completa validazione dei metodi bioanalitici devono fare riferimento alle attuali linee guida internazionali (2-4), tuttavia, queste devono essere riesaminate e rimodulate a causa delle caratteristiche intrinseche della tecnologia LC-MS.

Selettività

La selettività o specificità di un metodo potrebbe essere influenzata dalla presenza di analiti e/o metaboliti interferenti, dal protocollo seguito per la preparazione del campione e dal metodo strumentale utilizzato come ad esempio la separazione cromatografica, e/o il "cross-talk". Il metodo cromatografico deve essere in grado di differenziare nella matrice biologica sia gli analiti d'interesse sia lo IS dai composti endogeni o da altri componenti presenti nel campione del paziente (2). La selettività deve essere provata analizzando almeno 6 diverse matrici bianche o surrogate "neat" (per la quantificazione di composti endogeni), le quali devono essere analizzate individualmente, verificando l'assenza di potenziali interferenti. Se vengono analizzate delle molecole esogene, possono essere usati 6 campioni di pazienti che non contengono la molecola d'interesse. In campo clinico, al fine di valutare i principali contaminanti dei prelievi ematici, suggeriamo di usare anche almeno due matrici iperlipidemiche e almeno due matrici emolizzate. Inoltre, devono anche essere considerati i principali contaminanti che potrebbero essere presenti nella popolazione dello studio (come ad esempio popolazioni soggette a ittero). Solo in caso di uso di matrici rare (quali essudati, fluido cerebrospinale, tessuti solidi) e per applicazioni non routinarie (per ricerca) il numero di tali prove può essere ridotto, anche se non è consigliabile farlo. Generalmente, l'assenza di interferenti è accettata quando la risposta per gli analiti è al di sotto del 20% del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) e del 5% per lo IS, come riportato nelle linee guida (2). Queste regole andrebbero applicate a tutti i seguenti

problemi di validazione specifica.

Valutazione delle interferenze tra IS marcati con isotopi stabili e analiti. Si suggerisce di fare riferimento alle linee guida dell'EMA per questo sotto-paragrafo (2). Per ciascun analita analizzato nel metodo, la procedura dovrebbe essere effettuata in almeno tre replicati per ogni matrice fortificata analizzata. Tuttavia, la specificità per tutti gli analiti (inclusi gli standard interni) deve essere verificata.

Valutazione delle interferenze date da altri analiti e/o metaboliti, comunemente riscontrabili nella matrice. Come richiesto nelle linee guida, per tutti i metodi è necessario valutare quali tra i possibili analiti che potrebbero interferire con gli analiti d'interesse, possono essere riscontrati nei campioni dei pazienti. Ad esempio, un metodo sviluppato per quantificare farmaci antiretrovirali nel plasma deve tener conto di tutti i farmaci co-somministrati, dei metaboliti e di tutti i composti con una struttura chimica simile che potrebbero interferire con l'analisi (13, 14).

Anche per le procedure considerate in questo sottocapitolo è opportuno fare riferimento alle attuali linee guida EMA (2). Per questo argomento, l'uso di campioni reali (almeno 30) da pazienti è cruciale. In particolar modo, se consideriamo i farmaci, campioni con differenti tempi di campionamento (con orari differenti rispetto all'ultima assunzione del farmaco da parte del paziente) dovrebbero essere analizzati: almeno 15 campioni con concentrazioni basse (C_{min} o C_{trough}) e almeno 15 campioni con concentrazioni alte (C_{max}). Questi risultati dovrebbero sempre essere analizzati facendo riferimento ai dati clinici disponibili.

Potrebbe essere anche necessario valutare l'esistenza di qualche interferenza causata da:

- Metaboliti conosciuti del farmaco(i) e di composti isobari (1); deve essere studiata la possibilità di modifiche dei metaboliti o di altre molecole in composti isobari dell'analita. Speciale attenzione deve essere riservata ai metaboliti instabili (quali per esempio metaboliti acidi, esteri idrossili, N-ossidi o metaboliti glucoronati,) che possono modificare le loro strutture durante la preparazione e analisi in massa dei campioni (procedure estrattive e/o decadimento nella sorgente) trasformandoli in composti isobari dell'analita.
- Interferenze date da prodotti di degradazione generati durante la preparazione dei campioni (1); nel caso di preparazioni complesse (che richiedono ad esempio idrolisi o derivatizzazioni) è necessario valutare la presenza o l'assenza di picchi interferenti derivati dal trattamento del campione. Questa valutazione può essere fatta analizzando almeno sei differenti campioni ottenuti da pazienti reali. Se i picchi interferenti hanno dei tempi di ritenzione vicini a quelli dell'analita(i) e/o dello/degli IS, devono essere separati cromatograficamente, oppure i metodi devono essere ottimizzati al fine di effettuare questa totale separazione.

Per le molecole esogene, se si viene a conoscenza della presenza di isomeri (in particolare di isomeri con una

attività farmacologica differente), la separazione cromatografica dovrebbe essere totale (o almeno parziale) (15). Per verificare le interferenze durante le analisi di campioni reali, la valutazione di transizioni di massa multiple, assieme al rapporto delle loro intensità relative, permette di discriminare gli analiti target da tutte le possibili interferenze.

Carry-over

Il fenomeno del carry-over deve essere studiato attentamente e minimizzato durante lo sviluppo di un metodo LC-MS, prima ancora della validazione. Durante la validazione il carry-over dovrebbe essere valutato iniettando campioni bianchi (o neat, per gli analiti endogeni) dopo il calibratore a più alta concentrazione di analita o dopo un campione con una concentrazione vicina al limite di quantificazione più alto (ULOQ) (2). La più alta concentrazione di analita alla quale non si osserva il carry-over [sopra il limite di rilevabilità (LOD) del metodo] è considerata la concentrazione alla quale il metodo non è influenzato da carry-over. Questa concentrazione deve essere valutata in tripla analisi. Come riportato dalle linee guida, il carry-over nel bianco (o nel neat) dopo un campione ad alta concentrazione non deve essere maggiore del 20% del LLOQ e del 5% per l'IS (2).

Se possibile, la procedura analitica deve essere modificata per rimuovere ogni carry-over, quando presente. Quando non vi è questa possibilità, le procedure devono riportare come affrontare il carry-over (per esempio, il segnale deve essere 10 volte più grande del segnale in un bianco che precede immediatamente il campione oppure questo deve essere analizzato od estratto nuovamente). Tuttavia, se il carry-over risulta inevitabile, è necessario fare riferimento alle attuali linee guida per decidere come comportarsi: per esempio, verifiche specifiche possono essere considerate e testate durante la validazione, e applicate durante le analisi dei campioni dei pazienti, in modo da non influenzare l'accuratezza e la precisione (2). Questo può includere iniezioni nel sistema LC-MS di fasi mobili o di bianchi (o di neat) dopo i campioni che si pensa possano avere una elevata concentrazione e prima dell'iniezione del successivo campione (2).

Limite inferiore di quantificazione

Il LLOQ rappresenta la più bassa concentrazione di analita, misurata su 40 replicati per almeno 5 sedute analitiche (come indicato nelle ultime linee guida) che fornisce un picco identificabile con una precisione del 20% e un'inaccuratezza del 15%. Il LOQ dovrebbe essere utilizzato come punto più basso della curva di calibrazione (2).

Procedura suggerita per la determinazione di LOQ e LLOQ per le molecole esogene. Aggiungere quantità scalari di standard analitico a una matrice liofilizzata, se disponibile in commercio. Se non è disponibile utilizzare 6 matrici diverse provenienti da 6 diversi soggetti.

Procedura suggerita per la determinazione di LOQ e LLOQ per le molecole endogene.

- Aggiungere quantità scalari di standard analitico a una matrice surrogata, se disponibile, ed effettuare le misure come descritto sopra.
- Se le curve di calibrazione sono state costruite con il metodo della calibrazione con doppia marcatura aggiungere quantità scalari dell'analita Dx (contenente x deuteri) alla matrice e effettuare le misure come descritto sopra.

Curva di calibrazione

Per ogni analita studiato ci deve essere una curva di calibrazione che copra un intervallo di valori clinicamente significativo. Gli standard di calibrazione possono contenere più di un analita. La risposta (segnale, area/altezza del picco) dello strumento in relazione alla concentrazione di analita deve essere valutata e descritta adeguatamente nell'intervallo di concentrazione specificato (2-5).

La curva deve essere preparata utilizzando un minimo di 6 livelli di concentrazione. Il LLOQ dovrebbe essere usato come primo punto della curva. Nel caso in cui la sensibilità del metodo permetta di avere un LLOQ basso, molto al di sotto del valore di interesse clinico, si può utilizzare un primo punto di calibrazione con valore più alto del LLOQ. Nella curva deve essere presente il calibratore zero (non utilizzato solitamente per costruire la curva) ovvero la matrice priva dell'analita, ma contenente lo IS. La curva di calibrazione dovrebbe essere inserita all'inizio di ciascuna seduta analitica (eventualmente anche alla fine per metodi e/o sessioni di analisi molto lunghe). E' possibile un'eccezione a questa regola solo se il laboratorio può dimostrare di ottenere gli stessi risultati con una diminuzione della frequenza di calibrazione, ma non è consigliabile.

L'equazione generalmente che meglio descrive la curva di calibrazione è di tipo lineare. Per ogni curva di calibrazione con un'equazione: $Y = bX + a$, si raccomanda di valutare R^2 (ideale $> 0,995$), pendenza e intercetta. Inoltre si raccomanda di valutare l'inaccuratezza dei calibratori confrontando i valori ottenuti per ogni punto (estrapolati dalla curva) con i valori teorici; la differenza non deve essere superiore al 15% tranne che per il LOQ per il quale può essere del 20%. Questo criterio deve essere soddisfatto da almeno il 75% dei punti di calibrazione se la curva è processata una sola volta e dal 50% dei punti di calibrazione se la curva è processata due volte durante la seduta analitica (2).

Il materiale utilizzato per la preparazione delle curve di calibrazione deve essere del massimo grado di purezza disponibile. I calibratori possono essere acquistati se commercialmente disponibili, oppure preparati dal laboratorio. Quando è possibile si raccomanda di utilizzare "Certified reference materials" (CRM) (sciolti in matrice o anche in solvente) per validare i calibratori utilizzati, in quanto il valore dei CRM è assegnato mediante metodi di riferimento. Le curve di

calibrazione dovrebbero essere preparate aggiungendo quantità note di standard alla stessa matrice utilizzata per l'analisi. E' preferibile usare matrici provenienti da almeno 6 soggetti diversi ad eccezione dei calibratori preparati in matrici rare. Le curve di calibrazione possono essere congelate se si dimostra che l'analita è stabile mediante studi appropriati di stabilità (2-5). Nel caso di molecole endogene è possibile utilizzare diversi approcci in base alla disponibilità di materiali in commercio: se sono disponibili in commercio, si raccomanda di utilizzare curve di calibrazione certificate preparate in matrice; se non sono disponibili standard commerciali, aggiungere quantità note di standard a una matrice surrogata.

Calibrazione con doppia marcatura. Se disponibili standard con diverso numero di isotopi (es Dx/Dy con $x \geq 3$ e $y-x \geq 3$), preparare la curva di calibrazione aggiungendo quantità note di standard Dx (contenente x deuteri, ad esempio) alla matrice e utilizzare lo standard Dy come IS. Nel caso non fosse possibile preparare una matrice surrogata con le caratteristiche necessarie, è possibile preparare le curve di calibrazione in solvente dopo averle accuratamente confrontate con quelle preparate in matrice eseguite con il metodo delle aggiunte. La differenza delle pendenze e delle intercette deve essere inferiore al 5%.

Sensibilità. La sensibilità (capacità discriminare tra l'intensità di due segnali di campioni a concentrazione diversa) in cromatografia può essere confusa con il LOD, ovvero la concentrazione alla quale il rivelatore restituisce un segnale dell'analita almeno 5 volte superiore il segnale di base di un campione bianco o pulito. Nelle ultime linee guida FDA del 2013 la sensibilità viene definita come "la concentrazione minima di analita che può essere misurata con precisione e accuratezza accettabili (precisamente il LLOQ)" (3).

Accuratezza ed esattezza

L'esattezza o inesattezza (bias) rappresenta il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da diverse determinazioni dello stesso misurando e un valore di riferimento accettato (detto anche valore vero del misurando). Viene espressa come bias che è lo scostamento sistematico rispetto al valore vero (la differenza tra il valore ottenuto e il valore vero) che può quindi essere positivo oppure negativo. L'esattezza non deve essere considerata un sinonimo dell'accuratezza, termine che attualmente viene utilizzato per indicare il grado di concordanza fra il risultato di una singola misurazione e il valore vero del misurando, e questo viene espresso come errore totale della misura (5). L'esattezza dipenderà da quanto accurata è la scelta dei materiali di calibrazione, la loro concentrazione e soprattutto dalla scelta della matrice che deve essere il più possibile commutabile con quella dei campioni reali. È preferibile utilizzare calibratori tracciabili con un grado di incertezza definito.

L'esattezza può essere valutata come bias

utilizzando un materiale di riferimento certificato [come ad esempio i materiali certificati del National Institute of Standards & Technology (NIST)] oppure, se non disponibile, con materiali provenienti da valutazioni esterne di qualità che hanno un valore target assegnato con un metodo di riferimento standard. Qualora questi materiali certificati non siano disponibili, dovrà essere valutato il recupero percentuale mediante aggiunta degli analiti di interesse su campioni di bianco (matrice senza la presenza dell'analita) oppure in caso di sostanze endogene, per cui la matrice priva di analita non è disponibile, è preferibile utilizzare campioni reali o materiali di controllo di qualità (QC). Il recupero, parametro che indica la quantità di analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità totale, viene espresso come percentuale del rapporto tra la concentrazione aggiunta (nella fase di valutazione dello stesso) rispetto a quella misurata. La differenza tra il recupero ottimale (100%) e il valore ottenuto determina il valore di bias% da utilizzare per valutare l'esattezza del metodo.

Utilizzare più di un approccio è decisamente raccomandato, in modo tale da assicurare una valutazione più accurata e completa possibile dell'esattezza.

L'esattezza deve essere valutata analizzando per almeno cinque misurazioni replicate in almeno tre differenti sedute analitiche per concentrazione, utilizzando almeno tre campioni a concentrazioni clinicamente rilevanti tali da coprire l'intero intervallo di calibrazione del metodo. L'esattezza così misurata viene valutata come bias percentuale con la seguente formula:

$$\text{Bias\%} = \frac{(\text{valore medio delle misurazioni} - \text{valore vero})}{\text{valore vero}} \times 100$$

Un approccio alternativo, ma ugualmente valido, per la valutazione dell'esattezza è la comparazione con un metodo di riferimento, oppure con un metodo universalmente riconosciuto a maggior livello di standardizzazione. Devono essere utilizzati almeno 40 campioni di pazienti che coprano l'intero intervallo di misurazione e deve essere valutato lo scostamento medio in termini di bias percentuale. Una comparazione con un metodo privo delle caratteristiche di standardizzazione sopra citate non può essere utilizzato per valutare l'esattezza ma semplicemente per definire la correlazione tra due metodi analitici. Il bias% per ogni livello di concentrazione non deve essere superiore al 15%, ad eccezione dell'esattezza al valore di LLOQ che non deve essere superiore al 20%. Questi valori di accettabilità possono essere non validi qualora esistano documenti riconosciuti validi come linee guida locali o regionali o specifiche per una determinata classe di sostanza (ad esempio per i farmaci) oppure da criteri universalmente riconosciuti basati sulla variabilità biologica.

Da ricordare comunque che l'accuratezza è la contemporanea sussistenza di esattezza e precisione, come definito in statistica.

Precisione

La precisione o imprecisione di un metodo analitico è definita come il grado di concordanza fra misurazioni indipendenti di concentrazione di un'analita e deve includere tutto il processo di analisi, dalla raccolta del campione e conservazione, alla preparazione (estrazione e purificazione) fino all'analisi strumentale (2-5). Per una valutazione adeguata della precisione devono essere preparate e conservate, nelle stesse e opportune condizioni (è essenziale verificare prima la stabilità dell'analita), più aliquote di una sufficiente quantità omogenea della matrice biologica utilizzata. Possono essere utilizzati, se disponibili commercialmente, materiali di controllo a più livelli di concentrazione. Sarà importante verificare che tra i materiali di controllo e i campioni dei pazienti non esistano delle discrepanze di matrice (è essenziale valutare prima l'effetto matrice). In alternativa, o meglio anche contestualmente, è preferibile utilizzare dei pool di diversi campioni di pazienti rispetto ai campioni singoli. La concentrazione dei materiali da valutare deve essere scelta in maniera tale da coprire l'intero intervallo di misurazione e, se previsto, deve includere un valore soglia o di decisione clinica. Nel caso non si riesca a ottenere dei pool a elevate concentrazioni si può effettuare una aggiunta di standard puro ("spiking"; il campione così trattato viene definito "spiked"). La precisione deve essere valutata per un minimo di tre livelli di concentrazione (basso, medio ed elevato). Qualora si utilizzassero materiali di controllo commerciali è necessario valutare la precisione anche per almeno un pool di campioni per verificare l'effettiva commutabilità della matrice.

La precisione deve essere valutata con almeno 10 misurazioni indipendenti per ogni livello di concentrazione e viene espressa come coefficiente di variazione percentuale con la seguente formula:

$$\%CV = \frac{DS \text{ della Media} \times 100}{\text{Media}}$$

La precisione deve essere valutata sia nella stessa seduta analitica (precisione nella serie o ripetibilità) che tra sedute analitiche diverse (precisione tra le serie o precisione intermedia). Quest'ultima è una valutazione della precisione nel tempo, ed è consigliato utilizzare operatori, calibratori, reagenti differenti entro un arco temporale che non deve eccedere i 30 giorni per minimizzare gli effetti dovuti ad altre variabili nelle condizioni sperimentali. Per i campioni con una concentrazione pari ai tre controlli di qualità (alto, medio e basso), il CV non deve essere superiore al 15%; per i campioni con una concentrazione pari al LLOQ, il CV non deve essere superiore al 20% (2, 3). Valori superiori di imprecisione possono essere accettati o valori di imprecisione inferiore devono essere rispettati, qualora esistano documenti riconosciuti validi come linee guida locali o regionali o specifiche per una determinata classe di sostanza (ad esempio i farmaci) oppure da criteri universalmente riconosciuti basati sulla variabilità biologica.

Recupero

L'elevato recupero dell'analita dalla matrice è un risultato desiderabile della preparazione del campione, ed è quindi una caratteristica importante della procedura di estrazione (2, 3). La valutazione del recupero è suddivisa in recupero assoluto, relativo e recupero dell'estrazione.

Il recupero assoluto è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuto da un campione di matrice bianca fortificata con l'analita, trattata seguendo l'intera procedura analitica, e un campione standard pulito e direttamente iniettato nello strumento, che rappresenta il recupero del 100%. Quando non è disponibile una matrice bianca, si consiglia di utilizzare almeno 6 campioni con bassa concentrazione di analita misurata prima della procedura di recupero.

*Recupero assoluto = [risposta dell'analita inserita in campione bianco (processato) / risposta dell'analita dello standard pulito (non processato)]*100*

Il recupero relativo è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuto da un campione in bianco con l'aggiunta dell'analita e un campione standard pulito, entrambi trattati secondo l'intera procedura analitica.

*Recupero relativo = [risposta dell'analita inserita in campione in bianco (elaborato) / risposta dell'analita di standard ordinato (elaborato)]*100*

Per entrambi, il recupero dell'analita non deve essere necessariamente al 100%, i criteri di accettazione sono soddisfatti quando i risultati sono tra 90-110%. Il recupero dell'estrazione è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuta da un campione di matrice vuota fortificata con l'analita prima del trattamento e lo stesso campione in bianco fortificato con l'analita, alla stessa concentrazione nominale, dopo essere stato trattato secondo l'intera procedura analitica.

*Recupero dell'estrazione = [risposta dell'analita "spiked" prima dell'estrazione (processato) / risposta dell'analita "spiked" dopo l'estrazione]*100*

Il recupero dell'estrazione di un analita e del suo IS devono essere coerenti e riproducibili (criteri di accettazione 60-140%), possibilmente con un errore standard relativo inferiore al 10%. Una percentuale minore e più elevata di recupero (<60% e >140%) potrebbe essere accettata solo se l'errore standard relativo fosse inferiore al 5% per entrambi (analita e IS), indicando un'elevata riproducibilità e robustezza del metodo. Un recupero <60% e >140% deve comunque essere valutato attentamente e giustificato.

Per valutare se le perdite di analita nell'estrazione sono dovute a effetti matrice o realmente a scarsa estrazione, tutti gli esperimenti di recupero dovrebbero essere eseguiti durante lo sviluppo del metodo. Gli esperimenti relativi al recupero dovrebbero essere

effettuati e determinati per almeno 6 campioni di pazienti o 6 diversi lotti di matrice commerciale, per almeno 10 determinazioni nell'intervallo delle concentrazioni previste, utilizzando anche matrici bianche con lipidi e matrici emolizzate, o campioni di pazienti. In particolare, l'aggiunta di concentrazioni note di analiti deve essere eseguita e valutata (come avviene per valutare il recupero) con i campioni bianchi e per i pazienti con iperlipidemia o emolisi. Quando non è disponibile un campione bianco (per analiti endogeni) si dovrebbe utilizzare una matrice alternativa; ad esempio una matrice trattata appositamente o matrice surrogata (ad esempio siero bovino o umano in tampone fosfato).

Test della integrità della diluizione

In alcuni casi può essere necessario diluire il campione: per esempio quando si ha una concentrazione sopra il punto più alto di calibrazione (oppure al di sopra dell'ULOQ) o quando sono disponibili solo piccole quantità di campione oppure dopo la preparazione del campione per adattarsi alle condizioni cromatografiche (ad esempio un loop nell'autocampionatore, o saturazioni della colonna).

La valutazione della integrità della diluizione deve far parte della validazione parziale (2, 3). Inoltre, visto che la diluizione del campione può influenzare l'accuratezza, il bias e la precisione, l'effetto della diluizione deve essere valutato durante la validazione (2, 3). La diluizione dei campioni estratti deve essere una parte di un metodo validato. L'inaccuratezza e il bias che ne derivano devono essere al di sotto del 15%. Se la validazione della diluizione non viene valutata, i campioni con concentrazioni al di sopra del più alto punto della curva di calibrazione, devono essere riportati in referto come "al di sopra del punto di calibrazione più elevato" o come "maggiore di ULOQ".

Effetto matrice

L'effetto matrice (ME) è uno dei più importanti parametri da investigare durante lo sviluppo di un metodo in spettrometria di massa; tale effetto può dare origine a una soppressione o, più raramente, a un incremento del segnale (16). L'effetto matrice è collegato all'eluizione di componenti della matrice del campione in analisi, quali i fosfolipidi, gli acidi organici, i sali, capaci di influenzare lo stato di carica all'interno della sorgente ionica. Questo effetto può condizionare parametri quali il LOD, il LOQ, la precisione e l'accuratezza del metodo. Per questo motivo, l'effetto matrice di un metodo dovrebbe essere entro $\pm 20\%$; in caso contrario il laboratorio deve valutare il suo impatto sugli altri parametri di validazione. Se il ME supera $\pm 20\%$, potrebbero essere necessarie modifiche al metodo cromatografico e/o alla preparazione del campione e/o all'IS.

I campioni utilizzati per lo studio del ME devono rispecchiare la tipologia di campioni per cui il metodo è stato sviluppato, partendo dalle medesime matrici

biologiche (plasma, sangue intero, saliva, urine, biopsie, campioni *post mortem*); devono poi essere valutate specifiche condizioni clinico/patologiche (campioni iperlipemici, presenza di disfunzioni metaboliche). Nel caso di matrici derivanti da sangue (sangue intero, plasma, siero) è altamente consigliata la valutazione del ME dei principali contaminanti (inclusi emolisi, iperlipidemia, iperbilirubinemia). Ogni valutazione sul ME deve essere effettuata utilizzando lo stesso tipo di provetta utilizzata per il prelievo (con il medesimo anticoagulante) che verrà utilizzata in fase di campionamento. Nel caso in cui si vogliano utilizzare più tipi di provette, bisogna effettuare la valutazione del ME per ogni tipo di agente anticoagulante o additivo presente nelle provette da prelievo che si vogliono validare. L'effetto matrice deve essere studiato al fine di poter ipotizzare e/o identificare la sua origine, specialmente per gli effetti matrice positivi. Se l'ME è difficile da eliminare, in quanto generato da fattori intrinseci, quali il pH, o la presenza di sali, il laboratorio deve verificarne l'impatto su LLOQ, precisione e accuratezza e dichiararne la presenza e l'entità sul rapporto di validazione.

Valutazione dell'effetto matrice post-estrazione. La valutazione post-estrazione dell'effetto matrice è il metodo di eccellenza in quanto ne permette una misurazione diretta sia sugli analiti che sugli standard interni. I campioni privi di analita (neat) e i campioni fortificati post-estrazione devono essere preparati da almeno 6 lotti di campioni differenti e/o, se possibile, devono derivare da donatori differenti. La matrice priva di analita viene estratta secondo metodica. Al campione estratto viene aggiunta una quantità nota di analita. L'area dell'analita ottenuta da questo campione viene comparata con l'area ottenuta da una soluzione di analita in solvente con una concentrazione uguale al campione fortificato. L'analisi deve essere effettuata almeno su 6 lotti differenti di matrice commerciale o su 6 differenti donatori (ove disponibili) entrambi privi dell'analita. Nel caso non sia disponibile una matrice priva dell'analita, è possibile eventualmente effettuare un'analisi su 6 lotti differenti di matrice addizionati di un analita contenente isotopi stabili (come ad esempio ^2H , ^{13}C , ^{15}N) verificando accuratamente che i tempi di ritenzione di queste molecole siano identici a quelli degli analiti. In questo caso, prima di procedere con la valutazione dell'ME, è inoltre necessario verificare che l'analita non dia interferenze con l'isotopo stabile; questo per evitare che la presenza dell'analita nella matrice possa alterare i risultati del test. Per ogni lotto di matrice (o paziente) devono essere analizzate 3 differenti concentrazioni rappresentative della distribuzione dei valori biologici/patologici o terapeutici/tossici. Ad esempio, potrebbe essere utilizzato un valore pari a 3x il LLOQ o al punto più basso della curva di calibrazione (pari al valore del QC basso), uno in un punto intermedio della curva (o mediano tra LLOQ e ULOQ) e uno vicino, ma al di sotto, il punto più alto della curva di calibrazione (pari al valore del controllo di qualità alto o al ULOQ).

L'effetto matrice è calcolato indipendentemente per

ogni lotto di matrice/paziente e per ogni analita nel seguente modo:

$$ME\% = (A_{x \text{ Solvente}} / A_{x \text{ matrice}}) * 100$$

$A_{x \text{ Solvente}}$ = Area dell'analita "x" in solvente
 $A_{x \text{ matrice}}$ = Area dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione

La media dei ME% è comunemente utilizzata per la valutazione dell'effetto matrice.

Per alcune linee guida quali quelle emanate da EMA, FDA, Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2-5), la valutazione dell'effetto matrice percentuale è l'unica valutazione richiesta in tema di effetto matrice. Poiché la quantificazione di un analita viene effettuata come rapporto tra l'area dello stesso e uno IS, è facile comprendere come gli effetti matrice delle due molecole debbano essere messi in relazione tra loro per valutare l'effetto complessivo che le due molecole avranno sulla metodica. Su questo punto, solo le linee guida EMA forniscono una indicazione in merito, senza però entrare nello specifico (2).

La valutazione della relazione degli effetti matrice di analita e IS è particolarmente importante nel caso in cui si utilizzino IS non marcati con isotopi stabili o nel caso in cui si usino IS marcati con isotopi stabili ma con separazione con "Ultra High Performance Liquid Chromatography" (UHPLC) nella quale la differente acidità degli IS marcati con deuteri (^2H) potrebbe dare una sufficiente separazione cromatografica tale da non sovrapporre perfettamente i cromatogrammi di IS e analita (17-19). Per questo motivo la valutazione di un effetto matrice normalizzato (nME) (7) diventa importante al fine di valutare tutti gli analiti coinvolti nel metodo quantitativo (analita e IS). La formula per il calcolo del nME è così indicata:

$$nME\% = [(A_{x \text{ Solvente}}/A_{IS \text{ Solvente}})/(A_{x \text{ Matrice}}/A_{IS \text{ Matrice}})-1]*100$$

$A_{x \text{ Solvente}}$ = Area dell'analita "x" in solvente
 $A_{x \text{ matrice}}$ = Area dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione
 $A_{IS \text{ Solvente}}$ = Area dell'IS dell'analita X in solvente
 $A_{IS \text{ matrice}}$ = Area dell'IS dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione

L'effetto matrice normalizzato non deve eccedere il $\pm 15\%$, in caso contrario il laboratorio deve valutare l'impatto sugli altri parametri di validazione del metodo. Un ulteriore parametro da tenere in considerazione per una corretta valutazione dell'ME, è il CV% di tutti i singoli nME%. Il CV% dell'nME% rappresenta la robustezza del ME nel suo insieme. Il CV% non deve superare il 10%. Il rapporto finale di validazione del metodo deve riportare i valori di nME% e di CV% (7).

Valutazione con infusione post-colonna. Nel caso in cui il metodo precedentemente descritto non sia applicabile, ad esempio nel caso di composti endogeni per i quali non sia disponibile un isotopo stabile che abbia un cromatogramma perfettamente sovrapponibile

al cromatogramma dell'analita o nel caso in cui non sia possibile eliminare l'interferenza dell'analita sul suo isotopo, è possibile utilizzare il metodo della infusione post colonna. Tale metodo non è tuttavia da preferire, in quanto non fornisce un valore quantitativo dell'effetto matrice, ma definisce solo parametri qualitativi. Un campione di analita in solvente e 6 differenti lotti di matrice devono essere preparati secondo il metodo in validazione, ma senza l'aggiunta dello IS e analizzati. Contemporaneamente, una concentrazione nota di analita (o IS) viene infusa mediante una pompa siringa direttamente nell'eluente appena prima della sorgente ionica. La matrice influenzerà la ionizzazione dell'analita dispensato dalla pompa siringa producendo un cromatogramma con possibili picchi sia positivi che negativi. Tutti i campioni preparati devono essere testati a 3 differenti concentrazioni (come nel paragrafo precedente).

Poiché la valutazione del ME post-colonna è una valutazione qualitativa, all'interno del rapporto deve essere inserita una dettagliata descrizione di tutti gli analiti coinvolti (IS incluso) in termini di profilo cromatografico, tempi di ritenzione e intensità dell'effetto matrice osservato in relazione ai tempi di ritenzione dell'analita e del suo IS con osservazioni rispetto alla variazione dell'effetto matrice in base alla concentrazione. Per finire, è necessario includere una stima del rapporto dell'ME del bianco rispetto ai campioni in matrice in termini di caduta/incremento del segnale. Non essendo un metodo prettamente quantitativo, non è possibile definire dei valori di accettabilità del metodo; pertanto in caso di effetti matrice presenti ai tempi di ritenzione dell'analita e/o dello IS si consiglia di modificare le condizioni cromatografiche e/o il metodo di estrazione.

Stabilità

Lo studio della stabilità è una parte importante del metodo di validazione al fine di garantire una corretta gestione di tutti i reagenti e dei campioni durante l'intero processo di analisi (2-5). Lo studio della stabilità deve valutare tutte le soluzioni, reagenti e campioni durante: la raccolta dei campioni (prelievo), lo stoccaggio dei campioni a breve termine, lo stoccaggio dei campioni a lungo termine, i cicli di congelamento/scongelo, lo stoccaggio dopo processamento/estrazione (prima dell'analisi). I parametri e le condizioni da valutare dovrebbero eccedere o al limite coprire i normali tempi delle procedure di campionamento e analisi (come stimato dalla normale gestione del laboratorio). In generale le condizioni minime da valutare sono: stabilità a differenti tempi di conservazione e a differenti temperature, stabilità alla luce (indiretta ed eventualmente diretta), stabilità a ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

La stabilità deve essere analizzata su 3 aliquote indipendenti di almeno 2 concentrazioni differenti dell'analita (ad esempio uno a 3 volte il LLOQ -basso QC-, e uno vicino il ULOQ -alto QC-). Un campione è

considerato stabile alla specifica condizione in valutazione se la concentrazione media di ogni livello è entro $\pm 15\%$ della concentrazione determinata al tempo zero rispetto alla concentrazione media degli stessi livelli preparati con reattivi freschi (2). Una valutazione della stabilità basata solo su dati pubblicati non può essere considerata completa se non sufficientemente descritta e verificata.

La stabilità delle soluzioni stock e degli standard, sia degli analiti che degli IS deve essere valutata confrontandola con soluzioni fresche (ottenute da polveri standard o soluzioni pure), valutando le condizioni descritte in seguito.

Stabilità delle soluzioni e dei reagenti. La stabilità di: soluzioni standard di stoccaggio di lavoro degli analiti e IS, soluzioni di standard in matrice con e senza analiti, e soluzioni di reagenti preparate in laboratorio (miscele di solventi, tamponi, soluzioni saline, etc.) devono essere valutate rispetto a soluzioni preparate al momento (da standard in polveri o liquidi). Per le condizioni, valgono quelle descritte nel paragrafo stabilità a lungo termine.

Stabilità dopo cicli di congelamento/scongelo. Nel caso sia necessaria una conservazione di reattivi, campioni, controlli di qualità o calibratori congelati, in particolar modo se in forma liquida e confezionati in quantitativi maggiori di un singolo utilizzo, è necessario effettuare uno studio di stabilità ai ripetuti cicli di congelamento/scongelo. La stessa aliquota di un campione QC può essere sottoposta a diversi cicli di congelamento/scongelo. Il numero di cicli di congelamento/scongelo è solitamente di 3, ma la valutazione deve essere effettuata in proporzione al confezionamento del reattivo/campione in studio e pari al suo numero massimo di potenziali cicli di scongelamento (ad esempio, con un volume 3000 μL , e un utilizzo 100 μL , il numero di cicli massimi: 30). Per ogni ciclo i controlli di qualità devono essere posti a scongelare a temperatura ambiente (o alla temperatura di processamento) fino a completo scongelamento. Se un'aliquota viene utilizzata per effettuare lo studio di stabilità, la restante parte deve essere nuovamente congelata almeno per 12 ore alla temperatura dichiarata di conservazione ($-20\text{ }^\circ\text{C}$ o $-80\text{ }^\circ\text{C}$) prima di effettuare un nuovo ciclo di verifica della stabilità.

Stabilità a breve termine e gestione del prelievo. Al fine di valutare la stabilità del campione primario (il tubo primario di prelievo o del campionamento), bisogna aggiungere allo stesso, immediatamente dopo il prelievo (o appena possibile), una quantità nota di analita e conservarlo a temperatura ambiente ($25\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$) per almeno 24 ore. I periodi di tempo possono essere valutati compatibilmente con il tempo atteso di arrivo del campione dalla sede del prelievo alla sede di stoccaggio/processamento in laboratorio. In condizioni speciali, nel caso il campione debba essere spedito, o subisca un trasporto e/o nel caso la stabilità a $25\text{ }^\circ\text{C}$ sia troppo ridotta rispetto ai tempi di consegna del campione al laboratorio è necessaria una valutazione anche a $35\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ e/o $4/8\text{ }^\circ\text{C}$ e/o a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Si raccomanda di valutare tempi notevolmente maggiori rispetto al tempo

stimato, in quanto i campioni che non arriveranno in laboratorio in un tempo utile rispetto ai tempi di cui è stata valutata la stabilità, saranno da considerare non conformi e quindi non utilizzabili per l'analisi.

L'analisi deve essere effettuata su una sola tipologia di prelievo; l'uso di differenti tubi di raccolta del campione (o con anticoagulanti diversi, o provette con o senza gel o con conservanti (come ad esempio sostanze riducenti) richiede una rivalutazione della stabilità dell'analita. Inoltre, nel caso si debbano usare differenti coadiuvanti o conservanti, deve essere riconsiderato l'impatto sugli altri parametri di validazione.

Il rapporto di validazione deve dichiarare le condizioni di luce nelle quali viene condotto lo studio (conservazione al buio, luce non diretta, luce diretta). Lo studio deve essere condotto alle stesse condizioni di luce per l'intera durata dello studio; eventuali altre condizioni di luce possono essere valutate e dichiarate nel rapporto.

Stabilità a lungo termine. Tutti i reagenti, le soluzioni, i campioni, i controlli di qualità e i calibratori devono essere sottoposti a una valutazione di stabilità a lungo termine (2, 6). Questa valutazione può essere condotta, in base al tipo di soluzione testata, da 15 giorni (come ad esempio la stabilità a lungo termine dei campioni) fino a 1 anno o più (quando si tratti di reagenti, soluzioni, controlli di qualità) a discrezione del laboratorio. La stabilità a lungo termine deve essere testata a 25 ± 5 °C. Sulla base dei risultati della stabilità a breve termine, o dei risultati preliminari ottenuti a 25 ± 5 °C, ulteriori studi possono essere effettuati al fine di valutare temperature più basse (4/8 °C, -20 °C, -80 °C). Nel caso vengano utilizzati reattivi, campioni, controlli di qualità o calibratori liofilizzati, lo studio di stabilità a lungo termine deve essere condotto anche sui rispettivi risospesi/solubilizzati.

Il rapporto di validazione deve dichiarare le condizioni di luce a cui viene condotto lo studio (es. conservazione al buio, luce non diretta, luce diretta). Anche nella valutazione a lungo termine, lo studio deve essere condotto alle stesse condizioni di luce per l'intera durata dello studio; eventuali altre condizioni di luce possono essere valutate e dichiarate nel rapporto.

Stabilità dopo processamento/estrazione (prima dell'analisi). Una volta processato/estratto, il campione può essere analizzato dopo un certo periodo di tempo. Questo può essere dovuto al tempo di attesa nell'autocampionatore, oppure può essere necessario rianalizzare gli stessi campioni il giorno successivo o verificarsi una momentanea impossibilità di utilizzare lo strumento. Lo studio di stabilità viene solitamente condotto a 4-8 °C che è la classica temperatura di esercizio di un autocampionatore, per un minimo di 48 ore. Lo studio può anche essere condotto a temperature differenti in base alle necessità del laboratorio; nel caso sia prevista la conservazione previo congelamento, è necessario effettuare uno studio di stabilità sui cicli di congelamento/scongelo del campione processato/estratto.

Come per gli studi a breve e a lungo termine, anche

in questo caso il rapporto di validazione deve dichiarare le condizioni di luce nelle quali viene condotto lo studio, ad esempio, conservazione al buio, protetto dalla luce conservato in recipiente scuro, a luce indiretta, a luce diretta. Lo studio deve essere condotto alle stesse condizioni di luce per l'intera durata dello studio; eventuali altre condizioni di luce possono essere valutate e dichiarate nel rapporto.

Validazione parziale e kit commerciali

I kit commerciali (IVD) devono essere progettati, prodotti e validati seguendo la normativa europea di riferimento del maggio 2017 (6), ove, tra le varie novità, è stata introdotto l'obbligo di effettuare validazione clinica del kit. Nell'ambito della validazione di tali kit, è opportuno fare riferimento alle attuali linee guida e alla normativa vigente (2, 4, 6).

La validazione parziale deve essere applicata in caso di modifiche minori a metodi bioanalitici già validati in laboratorio oppure quando si utilizzano kit commerciali, possibilmente marcati CE (CE-IVD), ai quali siano state apportate modifiche. Modifiche o cambiamenti a metodi bioanalitici che rientrano in questa categoria includono: trasferimento di metodi bioanalitici tra laboratori o operatori; modifiche della metodologia analitica (cambio di sistema di rivelazione o di altro componente strumentale e/o configurazione, inclusa la piattaforma software); diverso anticoagulante (da eparina ad EDTA); diversa matrice impiegata (passaggio da urine a plasma); modifiche nelle procedure di processamento del campione o delle modalità di campionamento (impiego di dispositivi per matrici essiccate); modifiche nel volume di campione utilizzato (riduzione del volume in pediatria). Lo scopo della validazione parziale è quello di dimostrare che le modifiche applicate al metodo non inficiano le caratteristiche del metodo stesso.

Le validazioni parziali possono variare dalla sola rivalutazione di accuratezza e precisione entro e tra le serie, a una validazione quasi completa. La decisione su quali caratteristiche del metodo richiedano una validazione aggiuntiva va presa in base a considerazioni logiche su quelli che, presumibilmente, sono i parametri che possono essere stati inficiati dalle modifiche attuate al metodo. Ad esempio, una modifica alla fase stazionaria della colonna analitica o alla composizione della fase mobile potrebbero modificare la linearità e/o la selettività del metodo e/o l'effetto matrice che andrebbero quindi opportunamente rivalutate.

È importante sottolineare che una validazione parziale del metodo andrebbe effettuata ogni volta che si adotti un nuovo kit commerciale presso il proprio laboratorio. Tali metodi potrebbero essere stati infatti validati su strumentazioni completamente o parzialmente differenti da quelli effettivamente in uso, che potrebbero presentare caratteristiche analitiche diverse in termini di intervallo di misura, linearità, riproducibilità e così via.

Cross validazione

Per meglio comprendere gli argomenti descritti in questa sezione fare riferimento in particolare alle linee guida EMA (2).

La cross-validazione è una comparazione dei parametri di validazione tra più metodi bioanalitici, o tra diversi laboratori, che deve essere effettuata quando due o più metodi bioanalitici vengono utilizzati per generare dati all'interno dello stesso studio; quando lo stesso metodo bioanalitico viene utilizzato da due laboratori differenti per generare dati all'interno dello stesso studio; quando vengano effettuate modifiche considerate minori a un metodo esistente

Per effettuare la cross-validazione è necessario analizzare uno stesso set/lotto di QC o di campioni clinici utilizzando entrambi i metodi da confrontare. Per i QC l'accuratezza media ottenuta per entrambi i metodi deve essere entro il 15%. Per i campioni clinici la differenza tra i due valori ottenuti deve essere all'interno del 20% della media per almeno il 67% delle misure effettuate (2).

Ri-analisi di campioni clinici

I calibratori e i QC utilizzati durante la validazione potrebbero non essere sufficienti per mimare i campioni clinici reali in quanto potrebbero esserci differenze in grado di inficiare l'accuratezza e la precisione dell'analita. Tra queste possiamo elencare differenze nel legame con le proteine, conversione in metaboliti o presenza di co-mediezioni nei campioni reali. È perciò necessario valutare l'accuratezza nei campioni reali ri-analizzando i campioni clinici in sedute di lavoro differenti in giorni differenti utilizzando curve di calibrazione preparate invece ex-novo. In linea di massima, si raccomanda di ri-analizzare il 10% dei campioni nel caso in cui il numero totale dei campioni sia meno di 1000 e il 5% del numero dei campioni oltre i 1000 (2). È inoltre consigliabile analizzare campioni che coprano tutto l'intervallo delle concentrazioni attese.

La concentrazione ottenuta dalla prima analisi (originale) e quella ottenuta nella ri-analisi (ripetizione) dovrebbero essere all'interno del 20% della loro media per almeno il 67% delle ripetizioni effettuate.

La differenza percentuale dei risultati è determinata dalla seguente equazione:

$$(Ripetizione-Originale)*100/Media$$

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le analisi in LC-MS sono diventate uno strumento primario nelle determinazioni di medicina di laboratorio.

La comprensione della terminologia utilizzata, attraverso i regolamenti e le direttive provenienti da diversi Paesi, è diventata una sfida per i ricercatori e gli operatori bioanalitici. Fino ad oggi infatti, i ricercatori coinvolti nella validazione di metodi bioanalitici hanno utilizzato una serie di terminologie non univoche e chiare. Ad oggi, sono stati pubblicati lavori che

utilizzano protocolli per la validazione LC-MS con diversi livelli di accettazione. Questo causa una mancanza di armonizzazione dei risultati nonostante la tecnologia LC-MS sia sensibile e specifica.

Attualmente, non sono ancora state pubblicate in Italia delle linee guida dedicate alla validazione di metodi bioanalitici. Chi vuole sviluppare e validare un metodo quantitativo in LC-MS o LC-MS/MS deve fare riferimento alle più importanti linee guida internazionali (2-5), le quali però, in alcuni casi non sono abbastanza specifiche per la cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa o mancano di indicazioni specifiche per gli analiti endogeni. In alcune linee guida vi sono, infatti, lacune evidenti sulla validazione dei metodi in cromatografia accoppiati a spettrometria di massa (3, 4). Ad esempio, non sempre viene considerato che i campioni dei pazienti possono presentare delle alterazioni, come nel caso di campioni iperlipidemici, iperbilirubinemici o emolizzati (20). Queste possibili alterazioni devono essere assolutamente considerate nel processo di validazione di un metodo sia "home made" che commerciale e i risultati devono essere pubblicati o riportati nel rapporto di validazione e/o nel foglio informativo del kit diagnostico IVD (6).

Una limitazione aggiuntiva delle attuali linee guida, è l'assenza di informazioni sulla validazione di un metodo quantitativo per molecole endogene (2-5). Con questo documento, il gruppo di studio "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche" di SIBioC, ha cercato di colmare questa lacuna elencando i possibili passi da seguire e indicando alcuni protocolli di comportamento per la validazione di metodi per le molecole endogene.

Nel caso dei kit (CE-IVD o meno) usati per le analisi LC-MS in biochimica clinica, questi non sono sempre validati su tutti gli strumenti attualmente sul mercato (e sarebbe impossibile considerando le innumerevoli configurazioni e combinazioni strumentali possibili oggi e nel prossimo futuro). Questi kit (anche quelli con marchio CE-IVD) necessitano però almeno di una validazione parziale sugli strumenti disponibili in ciascun laboratorio, per rivalutare le caratteristiche dei metodi e ridefinire i possibili limiti.

In conclusione, le nuove regole e i protocolli riportati in questo lavoro non intendono sovrapporsi alle attuali linee guida, ma piuttosto possono dare un apporto positivo e aiutare coloro che eseguono la validazione di metodi LC-MS, sia artigianali che commerciali, raccomandando alcuni ulteriori passaggi da effettuare durante la validazione, con l'obiettivo finale di fornire i migliori risultati analitici possibili.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dott. Amedeo De Nicolò (Università di Torino) per le valutazioni statistiche, i suggerimenti e il supporto, la Dott.ssa Cinzia Benagli (Ente Ospedaliero Cantonale - Bellinzona) e la Dott.ssa Debora Pensi (Università di Torino) per la lettura critica del manoscritto.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Vogeser M, Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2010;56:1234-44.
2. European Medicine Agency Guideline on bioanalytical method validation, 2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
3. Food and Drugs Administration Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (Rev. 1), 2013 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>
4. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol* 2013;37:452-74
5. Clinical and Laboratory Standard Institute. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods. Approved Guideline C62-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014. https://clsi.org/media/1346/c62a_sample.pdf
6. Gazzetta Ufficiale del parlamento Europeo e del Consiglio. Regolamento (Ue) 2017/746 del 5 Aprile 2017 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=EN>
7. Nicolò A, Cantu M, D'Avolio A. Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry: the internal standard normalized matrix effect. *Bioanalysis* 2017;9:1093-105.
8. Baietto L, Simiele M, D'Avolio A. How effective is the use of DBS and DPS as tools to encourage widespread therapeutic drug monitoring? *Bioanalysis* 2014;6:425-7.
9. D'Avolio A, Simiele M, Siccardi M, et al. HPLC-MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. *J Pharm Biomed Anal* 2010;52:774-80.
10. Zimmer JS, Christianson CD, Johnson CJ, et al. Recent advances in the bioanalytical applications of dried matrix spotting for the analysis of drugs and their metabolites. *Bioanalysis* 2013;5:2581-8.
11. McCloskey LJ, Yoo JH, Stickle DF. Interpatient distributions of bloodspot area per fixed volume of application: comparison between filter paper and non-cellulose dried matrix spotting cards. *Clin Chim Acta* 2014;437:187-90.
12. Cangemi G, Barco S, Castagnola E, et al. Development and validation of UHPLC-MS/MS methods for the quantification of colistin in plasma and dried plasma spots. *J Pharm Biomed Anal* 2016;129:551-7.
13. D'Avolio A, Sciandra M, Siccardi M, et al. A new assay based on solid-phase extraction procedure with LC-MS to measure plasmatic concentrations of tenofovir and emtricitabine in HIV infected patients. *J Chromatogr Sci* 2008;46:524-8.
14. D'Avolio A, Siccardi M, Sciandra M, et al. HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;859:234-40.
15. D'Avolio A, De Nicolò A, Agnesod D, et al. A UPLC-MS/MS method for the simultaneous plasma quantification of all isomeric forms of the new anti-HCV protease inhibitors boceprevir and telaprevir. *J Pharm Biomed Anal* 2013;78-79:217-23.
16. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:328-34.
17. Iyer SS, Zhang ZP, Kellogg GE, et al. Evaluation of deuterium isotope effects in normal-phase LC-MS-MS separations using a molecular modeling approach. *J Chromatogr Sci* 2004;42:383-7.
18. Jemal M, Schuster A, Whigan DB. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:1723-34.
19. Wang S, Cyronak M, Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:701-7.
20. Perrin P, Cuerq C, Draï J, et al. T165. Hemolysis, lipemia and bilirubinemia: what impact on vitamins A, E, K, B6, B9, B12, C, beta-carotene and homocysteine concentrations? *Clin Chem Lab Med* 2015;53(SS):s763.

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

Giuseppe Lippi¹, Martina Montagnana¹, Fiamma Balboni², Andrea Bellone³, Ivo Casagrande⁴, Mario Cavazza⁵, Giorgio Da Rin⁶, Daniele Coen³, Davide Giavarina⁷, Fabrizio Giostra⁸, Stefano Guzzetti⁹, Paola Pauri¹⁰, Rodolfo Sbrojavacca¹¹, Tommaso Trenti¹², Marcello Ciaccio¹³, Gianfranco Cervellin¹⁴

¹Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Verona

²Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

³Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza, Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

⁴Dipartimento di Emergenza ed Accettazione, Azienda Ospedaliera di Alessandria, Alessandria

⁵Pronto Soccorso, Ospedale S. Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna, Bologna

⁶Struttura Complessa di Medicina di Laboratorio, AULSS 7 Pedemontana, Bassano del Grappa (VI)

⁷Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

⁸Medicina e Chirurgia d'Accettazione e d'Urgenza, ASUR Marche, Area Vasta 4 Fermo, Fermo

⁹Pronto Soccorso, Ospedale L. Sacco, Milano

¹⁰Unità Operativa Complessa Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero Carlo Urbani, Jesi

¹¹Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza, ASUI Udine, Udine

¹²Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, AUSL ed AOU di Modena, Modena

¹³Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo, Palermo

¹⁴Pronto Soccorso e Medicina d'Urgenza, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma

ABSTRACT

Biomarkers for diagnosing sepsis in the emergency department: a consensus document by SIBioC-Medicina di Laboratorio and the Academy of Emergency Medicine and Care. This article is drafted as a consensus document involving eight members of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine (SIBioC) and eight members of the Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC), to whom a questionnaire was submitted for obtaining opinions on some recommendations about the use of biomarkers for diagnosing sepsis and managing antibiotic therapy in the emergency department. These recommendations were drafted following the National Guidelines Program (PNLG). According to the cumulative consent, three "A" recommendations (strongly recommended indication) emerged, which include biomarker availability (always available on prescription), clinical use (always interpreted in according to clinical data) and timing of the request based on half-life of the analyte. Recommendations of type "B" (indications carefully considered) included a general agreement about the clinical usefulness of sepsis biomarkers, the combination of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP), the possibility to be free on prescription to the laboratory, the use of cut-offs favoring a high negative predictive value, the use of more analytically sensitive assays and the possibility of using PCT for monitoring antibiotic therapy, with timing of ordering defined according to the metabolism of the analyte. As regards the specific biomarkers, a similar "B" consensus has been reached for measuring both PCT and CRP, and for measuring lactic acid. The measurement of other biomarkers is discouraged except for presepsin, for which there is still substantial uncertainty in favor or against.

*Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica* ed *Emergency Care Journal*.

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Section of Clinical Biochemistry, University Hospital of Verona, Piazzale LA Scuro, 37100 Verona. E-mail giuseppe.lippi@univr.it; ulippi@tin.it

Ricevuto: 31.08.2017

Accettato: 06.09.2017

Pubblicato on-line: 25.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.006

INTRODUZIONE

All'incirca nel 700 avanti Cristo gli antichi greci identificarono con il termine σήψις (sepsi), inteso come decomposizione o marcescenza, una grave condizione clinica, ad alto rischio di morte, correlata a un'infezione (1). Malgrado questa lunga storia, solo nelle ultime decadi del secolo scorso i clinici hanno avvertito la necessità di una più precisa definizione della sindrome, e tre fondamentali – anche se non del tutto concordanti – pietre miliari sono state poste nel 1992, 2003 e 2016 (2). In seguito alla terza conferenza internazionale sulla definizione di sepsi e shock settico, la sepsi è stata definita come una “disfunzione organica pericolosa per la vita, causata da una disordinata risposta dell'ospite a una infezione” (3). È singolare che tale definizione riconduca sostanzialmente all'illuminante intuizione di William Osler, il quale, già all'inizio del '900, scrisse che “con rare eccezioni, sembra che il paziente muoia a causa della reazione del corpo all'infezione, piuttosto che a causa dell'infezione stessa” (4). Con il termine di shock settico si intende invece “un particolare tipo di sepsi, le cui profonde anomalie circolatorie, cellulari e metaboliche si associano a un maggior rischio di mortalità rispetto alla sepsi da sola”.

Riguardo all'epidemiologia, dati recenti attestano come la frequenza della sepsi sia ~2% nella popolazione generale ospedalizzata, ma possa aumentare fino al 6-30% nei pazienti ricoverati in terapia intensiva (5). Queste stime sono tuttavia influenzate da una considerevole eterogeneità in funzione dell'area geografica, della tipologia di presidio e dei reparti ospedalieri. In alcune realtà infatti oltre il 50% dei pazienti con sepsi grave è ricoverato in terapia intensiva, con un tasso di mortalità molto alto (28-50%) (6). Di particolare rilievo sono le conclusioni di uno studio osservazionale negli Stati Uniti, secondo cui la frequenza di sepsi nei pazienti ospedalizzati manifesterebbe un incremento prossimo al 9% per anno (7). Per quanto concerne il pronto soccorso, uno studio prospettico australiano ha recentemente dimostrato come la maggior parte (oltre il 97%) dei pazienti ricoverati con sepsi severa in terapia intensiva transitò per il pronto soccorso (8). Di particolare rilievo è il riscontro che in solo il 53% di questi pazienti la sepsi sia identificata durante il triage, enfatizzando pertanto la necessità di affinare ulteriormente gli strumenti diagnostici a disposizione della medicina d'urgenza.

Le conclusioni del gruppo Sepsis-3 semplificano sostanzialmente la classificazione rispetto a quanto stabilito in precedenza, così eliminando i sottogruppi della “Systemic Inflammatory Response Syndrome” (SIRS) e della sepsi grave, e mantenendo solo le due categorie della sepsi e dello shock settico (3). La SIRS è così scomparsa come condizione autonoma, venendo di fatto considerata una risposta fisiologica appropriata a un gran numero di condizioni infettive e non. Essa rimane quindi come insieme di segni e sintomi che caratterizzano la sepsi solo quando sia contemporaneamente presente un danno d'organo,

identificato con l'attribuzione di almeno due punti al “Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA) score” (3). Poiché l'insieme dei parametri contemplati da SIRS e SOFA score prevedono l'utilizzo di esami di laboratorio, gli autori hanno cercato e identificato un sistema clinico semplificato che consenta di formulare un alto grado di sospetto e di attenzione, già dal momento del triage. Questo sistema semplificato prevede la valutazione di tre semplici parametri: frequenza respiratoria, alterato stato mentale, pressione arteriosa. L'insieme dei tre parametri è stato incorporato in uno score semplificato di rapida applicazione, denominato quick-SOFA (qSOFA). La task force suggerisce che i criteri qSOFA debbano indurre, se positivi, a iniziare precocemente indagini volte alla ricerca di un eventuale danno d'organo, di una sorgente di infezione, nonché a iniziare o potenziare precocemente la terapia (3). Secondo le conclusioni della task force è quindi evidente che il qSOFA non rappresenti un criterio diagnostico, ma piuttosto una sorta di “bandiera rossa” di triage.

Sembra che la definizione di sepsi subisca ironicamente la stessa sorte della definizione di tempo; quanto più ci si avvicina, tanto più ci si sfugge. Le conclusioni della task force Sepsis-3 hanno già sollevato critiche e richieste di revisione e/o ulteriore validazione. Una delle maggiori critiche consiste nel fatto che la validazione dei criteri qSOFA è stata ricavata retrospettivamente in pazienti ricoverati in terapia intensiva, mancando quindi dati attendibili su ampie popolazioni di pazienti valutati in pronto soccorso e ricoverati nei reparti di degenza. Si rende pertanto necessaria una validazione prospettica in questi ambiti assistenziali (9). Un primo studio osservazionale condotto in ambiti esterni alla terapia intensiva non sembra sostenere l'utilità del qSOFA, che risulta avere una performance diagnostica decisamente inferiore a quelle dei criteri di MEWS e NEWS già diffusamente impiegati in molti dipartimenti di emergenza (10). In base alle nuove definizioni, sepsi e shock settico sono trattati come sindromi, non come malattie specifiche. Una limitazione maggiore all'utilizzo clinico nel singolo paziente rimane la difficoltà di determinare se la sepsi sia realmente secondaria a un'infezione, e quali siano l'eziologia e la sede dell'infezione.

E' noto come condizioni di shock che mimano la sepsi possano in realtà essere conseguenti a condizioni non infettive, quali la pancreatite acuta, i traumi maggiori, le ustioni, il tromboembolismo venoso (9). La ricerca della fonte settica, quando non immediatamente evidente, è dunque una priorità, che può essere sostenuta dall'impiego abituale della ecografia al letto del paziente (11). Continua quindi la ricerca di altri strumenti che aiutino il clinico, non solo a identificare i pazienti che presentano la sindrome clinica della sepsi, ma anche e soprattutto a definirne la potenziale eziologia e a stratificarne più accuratamente e nel più breve tempo possibile il rischio, giacché l'esito è fortemente influenzato dalla precocità di diagnosi e terapia conseguente (12, 13). Tra gli strumenti più

efficaci sono emersi, nelle ultime decadi, alcuni biomarcatori. Con il termine biomarcatore s'intende convenzionalmente un'analisi quantificabile in laboratorio, che consenta di migliorare l'accuratezza diagnostica, di semplificare algoritmi complessi e migliorare il processo decisionale clinico (14). Nell'ambito specifico della sepsi, un marcatore ideale dovrebbe consentire una diagnosi precoce (essere quindi misurabile prima, o contestualmente alla comparsa dei segni clinici), essere molto sensibile e specifico anche nella diagnosi differenziale fra forme infettive e non infettive, consentire di ottenere valide informazioni cliniche sul decorso e la prognosi della sepsi e fornire indicazioni attendibili per guidare l'eventuale terapia antibiotica.

STRATEGIA DI RICERCA

La strategia di ricerca si è svolta utilizzando i tre principali database di comprovato valore scientifico (Medline con interfaccia PubMed, Scopus e Web of Science) (15), utilizzando le parole chiave "sepsis" AND "biomarker(s)" AND "meta-analysis", senza restrizioni di lingua e/o data (Figura 1). La possibile esistenza di ulteriori meta-analisi pubblicate su riviste scientifiche

sull'argomento è stata accertata mediante valutazione della lista dei riferimenti bibliografici. Il titolo, il sommario e, quando necessario, il testo completo dei documenti identificati dalla ricerca sono stati valutati indipendentemente da due autori (GL e MM), escludendo tutte le meta-analisi in cui non fossero disponibili dati relativi alle prestazioni diagnostiche dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi e la gestione della terapia antibiotica. Dei documenti selezionati, quando disponibili, sono state quindi riportate le informazioni relative a: (a) ambito clinico di utilizzo dei biomarcatori; (b) numero di studi inclusi nella meta-analisi; (c) numero totale di pazienti inclusi nella meta-analisi e caratteristiche degli studi inclusi (prospettici e/o caso-controllo); (d) eterogeneità degli studi (significativa, >50%); (e) performance diagnostiche espresse in termini di area sotto la curva (AUC), sensibilità e specificità o efficacia clinica nel caso della gestione terapeutica; (f) valori soglia dei biomarcatori.

Il documento di consenso è stato redatto previa identificazione da parte di entrambe le Società scientifiche SIBioC e Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) di otto rappresentanti ciascuna, ai quali è stato somministrato un questionario con richiesta di esprimere un parere in merito ad alcune raccomandazioni per l'utilizzo dei biomarcatori in pronto soccorso per la diagnosi di sepsi e la gestione della terapia antibiotica. In accordo con il Programma Nazionale per le Linee Guida (PNLG) (16), le raccomandazioni sono state quindi formulate con un sistema di "grading" relativo alla forza delle raccomandazioni che da esse possono essere derivate, espresso in lettere (decrescenti da A a E), come riassunto in Tabella 1. Il questionario contenente le raccomandazioni è stato inviato mediante posta elettronica ai partecipanti, ai quali è stato richiesto di indicare la definizione della forza delle raccomandazioni secondo la Tabella 1 in merito alle singole raccomandazioni. Il grado finale della raccomandazione è stato espresso come media (e deviazione standard;

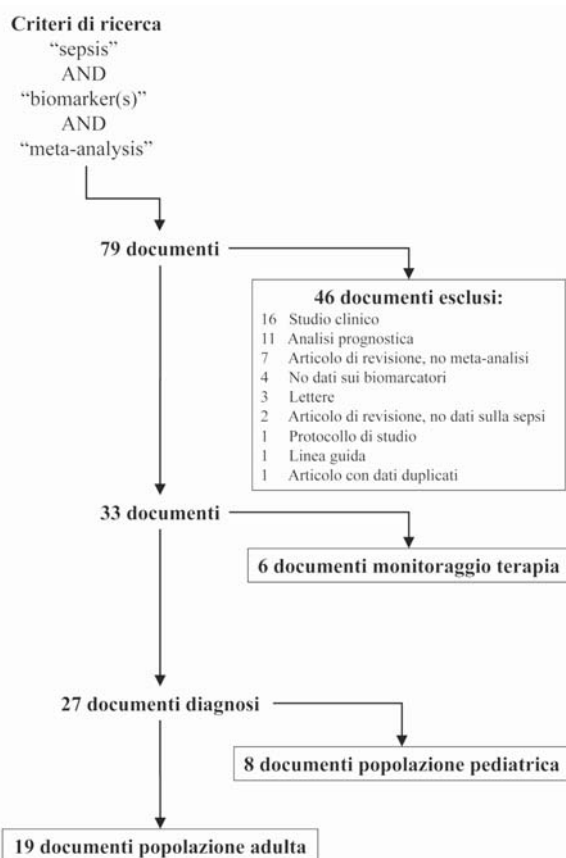


Figura 1
Strategia di ricerca.

Tabella 1

Definizione della forza delle raccomandazioni, in accordo il Programma Nazionale per le Linee Guida

- L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità.
- Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba sempre essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata.
- Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o l'intervento.
- L'esecuzione della procedura non è raccomandata.
- Si sconsiglia vivamente l'esecuzione della procedura.

Tabella 2*Meta-analisi relative all'utilizzo dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi*

| Autori (rif) | Biomarcatori | Valore soglia | Studi e popolazione | Setting | Eterogeneità | Risultati |
|--------------------------|--------------|--|--|--|---------------|--|
| <i>Adulti</i> | | | | | | |
| Uzzan et al, 2006 (17) | PCT, PCR | PCT: 0,6-5,0 ng/mL; PCR: 39-180 mg/L | 33 studi, 3943 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Pazienti in terapia intensiva per traumi e/o chirurgia | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,78 (95% CI, 0,71-0,84); sensibilità, 0,42-1,00; specificità, 0,48-1,00 • PCR: AUC, 0,71 (95% CI, 0,64-0,76); sensibilità, 0,35-1,00; specificità, 0,18-0,85 |
| Tang et al, 2007 (18) | PCT | 0,50-20 ng/mL | 18 studi, 2097 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Pazienti in terapia intensiva (14 studi) e/o pronto soccorso (4 studi) | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,78; sensibilità, 0,71 (95% CI, 67-76); specificità, 0,71 (95% CI, 67-76) |
| Wu et al, 2012 (19) | sTREM-1 | 40-3500 pg/mL | 11 studi, 1795 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Pazienti con infiammazione sistemica | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • sTREM-1: AUC, 0,87 (95% CI, 0,84 to 0,89); sensibilità, 0,79; specificità, 0,80 (sensibilità, 0,83 e specificità, 0,68 nei pazienti del pronto soccorso) |
| Wacker et al, 2013 (20) | PCT | 0,10-15,75 ng/mL | 30 studi, 3244 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Pazienti con infiammazione sistemica | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,85 (95% CI, 0,81-0,88); sensibilità, 0,77; specificità, 0,79 |
| Lee et al, 2013 (21) | PCT, PCR | PCT: 0,20-0,51 ng/mL; PCR: 30-175 mg/L | 4 studi, 760 pazienti (solo studi prospettici) | Popolazione anziana (≥65 anni) | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,89 (95% CI, 0,86-0,92); sensibilità, 0,83; specificità, 0,83 (sensibilità, 0,97 e specificità, 0,61 nei pazienti del pronto soccorso) • PCR: AUC, non calcolata; sensibilità, 0,91; specificità, 0,36 |
| Hoeboer et al, 2015 (22) | PCT | 0,15-17 ng/mL (ottimale: 0,5 ng/mL) | 58 studi, 16514 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Popolazione non selezionata | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,79; sensibilità, 0,76; specificità, 0,80 (AUC 0,78, sensibilità, 0,76 e specificità, 0,68 nei pazienti del pronto soccorso) |
| Ren et al, 2015 (23) | PCT | 0,5-30 ng/mL | 8 studi, 566 pazienti (tipologia degli studi non specificata) | Pazienti ustionati | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,92 (95% CI, 0,81-0,88); sensibilità, 0,74; specificità, 0,88 |
| Wang et al, 2015 (24) | nCD64 | Arbitrario | 8 studi, 1986 pazienti (tipologia degli studi non specificata) | Popolazione non selezionata | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • nCD64: AUC, 0,95 (±0,02); sensibilità, 0,76; specificità, 0,85 |
| Wu et al, 2015 (25) | Presepsina | 317-700 pg/mL | 9 studi, 2159 pazienti (solo studi prospettici) | Popolazione non selezionata | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • Presepsina: AUC, 0,89 (95% CI, 0,84-0,94); sensibilità, 0,78; specificità, 0,83 |

Tabella 2*Meta-analisi relative all'utilizzo dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi*

| Autori (rif) | Biomarcatori | Valore soglia | Studi e popolazione | Setting | Eterogeneità | Risultati |
|---------------------------|----------------|---|---|--------------------------------------|---------------|--|
| <i>Adulti</i> | | | | | | |
| Tong et al, 2015 (26) | Presepsina | 317-864 pg/mL | 11 studi, 3106 pazienti (10 studi prospettici, 1 studio caso-controllo) | Popolazione non selezionata | Significativa | • Presepsina: AUC, 0,89 (95% CI, 0,86-0,92); sensibilità, 0,83; specificità, 0,81 |
| Chengfen et al, 2015 (27) | PCT | 0,1-15,75 ng/mL | 24 studi, 3107 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Popolazione non selezionata | Significativa | • PCT: AUC in pazienti non-chirurgici, 0,80 (95% CI, 0,75-0,85); AUC in pazienti chirurgici, 0,71 (95% CI, 0,65-0,81); sensibilità, 0,74; specificità, 0,70 |
| Zhang et al, 2015 (28) | Presepsina | 317-729 pg/mL | 8 studi, 1815 pazienti (solo studi prospettici) | Pazienti con infiammazione sistemica | Significativa | • Presepsina: AUC, 0,89 (95% CI, 0,86-0,92); sensibilità, 0,86; specificità, 0,78 (sensibilità, 0,85 e specificità, 0,79 nei pazienti del pronto soccorso) |
| Zhang et al, 2015 (29) | Presepsina | 317-729 pg/mL | 11 studi, 3052 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Popolazione non selezionata | Significativa | • Presepsina: AUC, 0,88 (95% CI, 0,84-0,90); sensibilità, 0,83; specificità, 0,78 (lievemente inferiore nei pazienti del pronto soccorso; dati non presentati) |
| Zheng et al, 2015 (30) | Presepsina | 317-729 pg/mL | 8 studi, 1757 pazienti (solo studi prospettici) | Pazienti con infiammazione sistemica | Significativa | • Presepsina: AUC, 0,86 ($\pm 0,02$); sensibilità, 0,77; specificità, 0,73 |
| Chen et al, 2016 (31) | LBP | 27,3-64,4 μ g/mL | 8 studi, 1684 pazienti (solo studi prospettici) | Popolazione non selezionata | Significativa | • LBP; AUC, 0,68 (95% CI, 0,64-0,72); sensibilità, 0,64; specificità, 0,63 (sensibilità, 0,70 e specificità, 0,56 in pazienti di pronto soccorso o medicina generale) |
| Ma et al, 2016 (32) | IL-6, PCT, PCR | IL-6, 0,02-1000 pg/mL; PCT, 0,1-6,0 ng/mL; PCR, 11-400 mg/L | 22 studi, 2680 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Pazienti con infiammazione sistemica | Significativa | • IL-6: AUC, 0,80 ($\pm 0,03$); sensibilità, 0,68; specificità, 0,73 • PCT: AUC, 0,83 ($\pm 0,03$); sensibilità, 0,78; specificità, 0,67 • PCR: AUC, 0,71 ($\pm 0,02$); sensibilità, 0,78; specificità, 0,67 |

Tabella 2*Meta-analisi relative all'utilizzo dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi*

| Autori (rif) | Biomarcatori | Valore soglia | Studi e popolazione | Setting | Eterogeneità | Risultati |
|------------------------------|---|--|---|--|---------------|---|
| <i>Adulti</i> | | | | | | |
| Liu et al, 2016 (33) | PCT, PCR, IL-6, sTREM-1, presepsina, LBP, nCD64 | IQR: PCT, 0,5-1,7 g/mL; PCR, 38-140 mg/L; IL-6, 75-220 pg/mL; sTREM-1, 35-594 pg/mL; presepsina, 415-647 pg/mL; LBP, 24,3-32 µg/mL; nCD64, non specificati | 86 studi, 10438 pazienti (tipologia degli studi non specificata) | Pazienti con infiammazione sistemica | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,85 (0,82-0,88); sensibilità, 0,79; specificità, 0,78 • PCR: AUC, 0,77 (0,73-0,81); sensibilità, 0,75; specificità, 0,67 • IL-6: AUC, 0,79 (0,75-0,82); sensibilità, 0,72; specificità, 0,73 • sTREM-1: AUC, 0,85 (0,82-0,88); sensibilità, 0,78; specificità, 0,78 • Presepsin: AUC, 0,88 (0,85-0,90); sensibilità, 0,84; specificità, 0,77 • LBP: AUC, 0,71 (0,67-0,75); sensibilità, 0,62; specificità, 0,70 • nCD64: AUC, 0,96 (0,94-0,97); sensibilità, 0,87; specificità, 0,93 |
| Ni et al, 2016 (34) | suPAR | 2,7-9,5 ng/mL | 7 studi, 1062 pazienti (4 studi e 4812 pazienti con infiammazione sistemica; 6 studi prospettici e 1 studio caso-controllo) | Pazienti con e senza infiammazione sistemica | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • suPAR: AUC, 0,82 (95% CI, 0,78-0,85); sensibilità, 0,67; specificità, 0,80 (per diagnosi di sepsi in pazienti con infiammazione sistemica: AUC, 0,68 e 95% CI, 0,64-0,72; sensibilità, 0,61; specificità, 0,82) |
| Cabral et al, 2016 (35) | PCT | 0,5-5,0 ng/mL | 14 studi, 830 pazienti (studi prospettici/caso-controllo) | Pazienti ustionati | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,87 (±0,04); sensibilità, 0,77; specificità, 0,65 |
| <i>Neonati</i> | | | | | | |
| Yu et al, 2010 (36) | PCT, PCR | Non specificati | 22 studi, 2836 pazienti | Neonati | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT per sepsi neonatale certa: AUC, 0,77; sensibilità, 0,72; specificità, 0,77. • PCT per sepsi neonatale probabile: AUC, 0,88; sensibilità, 0,81; specificità, 0,92 • PCR per sepsi neonatale certa: AUC, 0,75; sensibilità, 0,55; specificità, 0,85. • PCR per sepsi neonatale probabile: AUC, 0,81; sensibilità, 0,77; specificità, 0,79 |
| Vouloumanou et al, 2011 (37) | PCT | 0,50-5,75 ng/mL | 16 studi, 1959 pazienti | Neonati | Significativa | <ul style="list-style-type: none"> • PCT: AUC, 0,87 (95% CI, 0,84-0,90); sensibilità, 0,81; specificità, 0,79 |

Tabella 2*Meta-analisi relative all'utilizzo dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi*

| Autori (rif) | Biomarcatori | Valore soglia | Studi e popolazione | Setting | Eterogeneità | Risultati |
|----------------------------|---------------|--|-------------------------|------------------------|-------------------|--|
| <i>Neonati</i> | | | | | | |
| Yuan et al, 2013 (38) | SAA, PCR | Non specificati | 9 studi, 823 pazienti | Neonati | Significativa | • SAA: AUC, 0,90 (95% CI, 0,87-0,93); sensibilità, 0,84; specificità, 0,89 • PCR: AUC, 0,92 (0,87-0,93); (95% CI, to); sensibilità, 0,67; specificità, 0,92 |
| Lv et al, 2014 (39) | TNF- α | 0,18-20000 pg/mL | 15 articoli e 23 trials | Neonati | Significativa | • TNF- α negli articoli: AUC, 0,74 (95% CI, 0,70-0,78); sensibilità, 0,66; specificità, 0,76 • TNF- α nei trials: AUC, 0,87 (95% CI, 0,85-0,89); sensibilità, 0,68; specificità, 0,73 |
| Zhou et al, 2015 (40) | IL-8 | 0,6-300 pg/mL | 8 studi, 548 pazienti | Neonati | Significativa | • IL-8: AUC, 0,89 (\pm 0,05); sensibilità, 0,78; specificità, 0,83 |
| Xu et al, 2016 (41) | PCR | 2,5-21,0 mg/L | 31 studi, 5698 pazienti | Neonati | Significativa | • PCR: AUC, 0,85 (\pm 0,05); sensibilità, 0,69; specificità, 0,77 |
| Shi et al, 2016 (42) | nCD64 | 1,63-6136 (unità di misura arbitraria) | 17 studi, 3478 pazienti | Neonati | Significativa | • PCR: AUC, 0,87 (\pm 0,02); sensibilità, 0,77; specificità, 0,74 |
| Pontrelli et al, 2017 (43) | PCT | 0,28-14,0 ng/mL | 17 studi, 1408 pazienti | Popolazione pediatrica | Non significativa | • PCT: AUC, non calcolata; sensibilità, 0,85; specificità, 0,54 |

IL-6, interleuchina 6; IL-8, interleuchina 8; IQR, range interquartile; LBP, "lipopolysaccharide-binding protein"; nCD64, "neutrophil CD64"; PCR, proteina C reattiva; PCT, procalcitonina; SAA, siero amiloide A; suPAR, "serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor"; sTREM-1, "soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1"; TNF- α , "tumor necrosis factor- α ".

DS) dei singoli giudizi, dopo riconversione del livello di grading in risultato numerico (A=1; B=2; C=3; D=4; E=5). Nello specifico, raccomandazioni con media finale <1,5 sono stati classificati come grado "A", con media compresa tra 1,5 e <2,5 come grado "B", con media compresa tra 2,5 e <3,5 come grado "C", con media compresa tra 3,5 e <4,5 come grado "D" e con media \geq 4,5 come grado "E".

RISULTATI

La ricerca sistematica, effettuata utilizzando le parole chiave descritte in precedenza, ha consentito di identificare 79 documenti dopo eliminazione dei replicati. Quarantasei prodotti sono stati esclusi, in quanto non pertinenti allo scopo della ricerca (Figura 1). Dei 33

documenti rimanenti, 6 erano relativi all'utilizzo dei biomarcatori per il monitoraggio della terapia antibiotica nei pazienti con sepsi [tutti relativi alla procalcitonina (PCT)], mentre 27 riguardavano l'utilizzo dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi. Otto di questi avevano come oggetto popolazioni pediatriche, i rimanenti 19 popolazioni adulte. L'accordo tra i due Autori che hanno analizzato i prodotti della ricerca è stato del 100%. I documenti relativi all'utilizzo dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi nella popolazione adulta (17-35) e in quella pediatrica (aggiunti per completezza) (36-43) sono riassunti in Tabella 2. I documenti relativi all'utilizzo dei biomarcatori per il monitoraggio della terapia antibiotica nei pazienti con sepsi sono riassunti in Tabella 3 (44-49). L'eterogeneità degli studi è significativa in quasi tutte le meta-analisi. In

Tabella 3*Meta-analisi relative all'efficacia dei biomarcatori per guidare la terapia antibiotica nella sepsi*

| Autori (rif) | Biomarcatori | Studi e popolazione | Setting | Eterogeneità | Risultati |
|-----------------------------|--------------|--|---|-------------------|---|
| Kopterides et al, 2010 (44) | PCT | 7 studi, 1131 pazienti | Terapia intensiva | Significativa | Riduzione di 4,2 giorni (95% CI, 3,4-5,0) durata della terapia antibiotica; riduzione del 18% costo della terapia antibiotica |
| Heyland et al, 2011 (45) | PCT | 5 studi, 947 pazienti | Terapia intensiva | Non significativa | Riduzione di 2,1 giorni (95% CI, 1,8-2,5) durata della terapia antibiotica; probabile beneficio economico |
| Schuetz et al, 2011 (46) | PCT | 14 studi, 4467 pazienti | Cure primarie, pronto soccorso, terapia intensiva | Non significativa | Riduzione del 29% (95% CI, 15-37%) della durata della terapia antibiotica (34%; 95% CI, 15-53 per pazienti del pronto soccorso) |
| Soni et al, 2013 (47) | PCT | 18 studi, numero di pazienti non riportato | Terapia intensiva | Non significativa | Riduzione di 2.0 giorni (95% CI, 1,5-2,6) durata della terapia antibiotica |
| Prkno et al, 2013 (48) | PCT | 7 studi, 1075 pazienti | Terapia intensiva | Non significativa | Riduzione del 27% (95% CI, 5-53%) della durata della terapia antibiotica |
| Andriolo et al, 2017 (49) | PCT | 10 studi, 1215 pazienti | Popolazione non selezionata | Significativa | Riduzione di 1.3 giorni (95% CI, 0,6-2,0) durata della terapia antibiotica |

*PCT, procalcitonina***Tabella 4***Riassunto della ricerca delle prestazioni dei singoli biomarcatori per la diagnosi di sepsi in popolazione adulta*

| Marcatore | n. meta-analisi | Range AUC | Range sensibilità | Range specificità |
|------------|-----------------|-----------|-------------------|-------------------|
| IL-6 | 2 | 0,79-0,80 | 0,68-0,72 | 0,73-0,73 |
| LBP | 2 | 0,68-0,71 | 0,62-0,70 | 0,56-0,70 |
| nCD64 | 2 | 0,95-0,96 | 0,76-0,87 | 0,85-0,93 |
| PCT | 10 | 0,78-1,00 | 0,71-1,00 | 0,61-0,88 |
| PCR | 3 | 0,71-0,77 | 0,75-0,91 | 0,36-0,67 |
| Presepsina | 6 | 0,86-0,89 | 0,77-0,85 | 0,73-0,88 |
| sTREM-1 | 2 | 0,85-0,87 | 0,78-0,83 | 0,68-0,78 |
| suPAR | 1 | 0,82 | 0,80 | 0,80 |

AUC, "area under the curve"; IL-6, interleuchina 6; LBP, "lipopolysaccharide-binding protein"; nCD64, "neutrophil CD64"; PCR, proteina C reattiva; PCT, procalcitonina; sTREM-1, "soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1"; suPAR, "serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor".

particolare, solo in quattro delle sei meta-analisi relative all'utilizzo dei biomarcatori per il monitoraggio della terapia antibiotica nei pazienti con sepsi, l'eterogeneità degli studi non è significativa. Nella totalità dei casi la principale fonte di eterogeneità negli studi inclusi nelle singole meta-analisi è imputabile alla diversità dei valori soglia utilizzati per i singoli biomarcatori (Tabella 2). Nella maggior parte dei casi le meta-analisi hanno incluso un elevato numero di studi prospettici (Tabella 2).

Il maggior numero di meta-analisi relative all'uso dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi in popolazione

adulta riporta dati di PCT (complessivamente dieci) (Tabella 4). Seguono sei meta-analisi contenenti dati di presepsina e tre meta-analisi con dati di proteina C reattiva (PCR). Dati di interleuchina 6 (IL-6), "lipopolysaccharide-binding protein" (LBP), "neutrophil CD64" (nCD64) e "soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1" (sTREM-1) erano disponibili in due meta-analisi per ognuno di questi marcatori, mentre una sola meta-analisi conteneva dati di "soluble urokinase-type plasminogen activator receptor" (suPAR). Per quanto concerne le prestazioni diagnostiche, espresse

Tabella 5

Cinetica di proteina C reattiva (PCR), procalcitonina (PCT) e presepsina e relativi valori soglia suggeriti per escludere una diagnosi di sepsi

| Parametro | Aumento | Picco | Emivita | Valore soglia per esclusione di sepsi |
|------------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------------|
| PCR | 12-24 ore | 48-72 ore | 20 ore | <10 mg/L |
| PCT | 2-4 ore | 6-8 ore | 20-24 ore | <0,5 mg/L |
| Presepsina | 2 ore | 3 ore | 4-5 ore | <500-600 pg/mL |

complessivamente in termini di AUC, i marcatori nCD64, PCT, presepsina, sTREM-1 e suPAR sembrano produrre risultati migliori per la diagnosi di sepsi nella popolazione adulta, malgrado nessuno di essi raggiunga una efficienza diagnostica prossima al 100% (Tabella 4). Le AUC di IL-6, LBP e PCR nella popolazione adulta sono complessivamente inferiori a quelle degli altri biomarcatori. I valori di sensibilità e specificità diagnostica sono in linea con quelli delle AUC (Tabella 4).

Un'ulteriore riflessione in merito all'utilizzo dei cinque biomarcatori con le migliori prestazioni diagnostiche (nCD64, PCT, presepsina, sTREM-1 e suPAR) riguarda la tecnologia analitica per la loro determinazione. Solamente per PCT e presepsina sono ad oggi disponibili analizzatori automatici o semi-automatici che ne consentano la quantificazione in regime di urgenza/emergenza, mentre per sTREM-1 e suPAR sono ad oggi disponibili solamente metodiche ELISA manuali. Ciò di fatto rende impraticabile, almeno al momento, il loro utilizzo per la diagnosi rapida della sepsi (50). Analoga considerazione può essere fatta per nCD64, la cui determinazione presuppone l'utilizzo di strumentazione basata su citometria a flusso e kit specifici, metodica difficilmente compatibile con la diagnosi di sepsi in urgenza/emergenza e peraltro non alla portata di molti laboratori clinici (50). La determinazione di PCT è oggi disponibile utilizzando una vasta gamma di metodiche commerciali basate su tecniche analitiche differenti (immunochemiluminescenza, immunofluorescenza, immunoturbidimetria) e potenzialmente applicabili su quasi tutti gli strumenti di chimica clinica e immunochimica disponibili nei laboratori clinici (51). La determinazione della presepsina è oggi possibile utilizzando un solo analizzatore, modello point-of-care (POC). Sempre nell'ambito della determinazione della PCT, le metodiche possono differire sostanzialmente in relazione alle prestazioni analitiche. Le tecniche a maggiore sensibilità sono generalmente caratterizzate da una funzionalità analitica $\leq 0,05$ ng/mL (51), e sono quelle che consentono pertanto una maggior attendibilità soprattutto per il monitoraggio della terapia antibiotica. Le caratteristiche di cinetica di PCT, presepsina e PCR in pazienti con sepsi sono descritte in Tabella 5 (52).

Per quanto concerne proteina siero amiloide A (SAA), "tumor necrosis factor" (TNF)- α e interleuchina 8 (IL-8), per ognuno di questi biomarcatori è stata identificata una singola meta-analisi in popolazioni pediatriche (Tabella 3), mentre non esistono meta-analisi

nella popolazione adulta. Ciò rende impossibile traslare le evidenze meta-analitiche al di fuori dell'ambito pediatrico.

Nell'ambito del monitoraggio della terapia antibiotica, tutte le sei meta-analisi identificate dalla ricerca della letteratura erano basate sulla determinazione della PCT. In tutti i casi si è potuto dimostrare come la determinazione di questo biomarcatore abbia consentito una significativa riduzione della durata della terapia antibiotica (Tabella 3). Nei due casi in cui è stato valutato anche l'aspetto economico, i protocolli di terapia antibiotica guidati dalla PCT hanno consentito di ridurre il costo globale nella gestione del paziente. Sfortunatamente esistono ad oggi scarse evidenze in merito all'efficacia di protocolli di terapia antibiotica guidati dalla PCT nel ridurre l'ampiezza dello spettro della terapia antibiotica somministrata. Ad esempio, uno studio retrospettivo su oltre 20000 pazienti ricoverati in 107 unità di terapia intensiva (UTI) non è riuscito a dimostrare alcun vantaggio di esito o di durata della terapia in una coorte di pazienti monitorati periodicamente con PCT (53).

RACCOMANDAZIONI

Alla luce dei dati disponibili in letteratura, e dei giudizi del gruppo di consenso, è stato quindi possibile formulare le seguenti raccomandazioni (lo score riflette la media e la DS dei giudizi individuali) (Tabella 6).

CONCLUSIONI

Alla luce dei consensi espressi individualmente, riassunti nel paragrafo precedente, emergono tre raccomandazioni di grado "A" (indicazione fortemente raccomandata), sostanzialmente concordi con quelle precedentemente pubblicate in Italia (54, 55), ma ora suffragate da una ricerca più sistematica e recente delle evidenze e da un consenso interdisciplinare tra una Società di Medicina di Laboratorio e una di Medicina d'Urgenza.

Le raccomandazioni di grado "A" sono relative all'eventuale modalità di richiesta del biomarcatore (sempre disponibile, anche in urgenza/emergenza), all'utilizzo clinico del biomarcatore (sempre interpretato alla luce della dei dati clinici) e al timing di richiesta basato sull'emivita dell'analita (Tabella 5). Raccomandazioni di tipo "B" (indicazione attentamente considerata) riguardano invece la reale utilità dei

Tabella 6*Raccomandazioni del gruppo di consenso*

| Raccomandazione | Score | Forza |
|--|-----------|-------|
| Nell'approccio diagnostico al paziente con sospetto di sepsi, la determinazione di un biomarcatore è di ausilio diagnostico | 1,56±1,06 | B |
| Nell'approccio diagnostico al paziente con sospetto di sepsi, la determinazione del biomarcatore deve essere: | | |
| • Sempre disponibile in urgenza/emergenza (24h/365 giorni) | 1,36±1,04 | A |
| • Richiedibile liberamente (cioè senza "previo accordo" con il laboratorio) al momento della formulazione della richiesta | 1,63±0,78 | B |
| Nell'approccio diagnostico al paziente con sospetto di sepsi, è consigliabile determinare: | | |
| • PCR | 2,00±0,94 | B |
| • PCT | 1,56±0,79 | B |
| • Presepsina | 2,50±1,06 | C |
| • LBP | 4,06±0,83 | D |
| • IL-6 | 3,88±0,99 | D |
| • sTREM-1 | 3,81±0,88 | D |
| • nCD64 | 3,69±0,92 | D |
| • suPAR | 3,50±0,79 | D |
| Il valore soglia del biomarcatore deve essere scelto: | | |
| • Privilegiando un elevato valore predittivo negativo, per escludere una diagnosi di sepsi | 1,75±0,83 | B |
| • Privilegiando un elevato valore predittivo positivo, per formulare una diagnosi di sepsi | 2,75±0,90 | C |
| Il risultato del biomarcatore deve sempre essere interpretato alla luce dei dati clinici | 1,00±0,00 | A |
| Nel caso della determinazione della PCT, devono essere utilizzati preferibilmente metodi a maggiore sensibilità analitica (funzionalità analitica ≤0,05 ng/mL) | 1,63±0,60 | B |
| Qualora il biomarcatore prescelto sia negativo in pazienti con forte sospetto diagnostico di sepsi, può essere utile la determinazione successiva di un secondo biomarcatore | 2,38±1,11 | B |
| Per ampia disponibilità di metodiche in automazione, turnaround time contenuto ed economicità della determinazione, l'eventuale secondo biomarcatore dovrebbe essere la PCR | 2,31±1,31 | B |
| Il timing del monitoraggio del biomarcatore nel paziente con sepsi deve considerare l'emivita in circolo della molecola (ripetizione non prima di 18-24 ore per PCT e PCR, non prima di 5 ore per presepsina) | 1,38±0,99 | A |
| La determinazione della PCT dovrebbe essere utilizzata per guidare la terapia antibiotica nei pazienti con sepsi | 1,50±1,00 | B |
| Il timing del monitoraggio del biomarcatore per il monitoraggio della terapia antibiotica del paziente con sepsi deve considerare l'emivita in circolo della molecola (ripetizione non prima di 18-24 ore per PCT) | 1,63±1,05 | B |
| Il pannello biochimico per diagnosi/monitoraggio della sepsi dovrebbe anche comprendere la determinazione dell'acido lattico | 1,50±0,79 | B |

Score: media e deviazione standard dei giudizi individuali dei partecipanti al Gruppo di Consenso.

IL-6, interleuchina 6; LBP, "lipopolysaccharide-binding protein"; nCD64, "neutrophil CD64"; PCR, proteina C reattiva; PCT, procalcitonina; sTREM-1, "soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1"; suPAR, "serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor".

biomarcatori nella diagnosi di sepsi, l'utilizzo combinato di PCT e PCR, la possibilità di essere liberamente richiedibile al laboratorio, l'utilizzo di valori soglia che prediligano il valore predittivo negativo, l'utilizzo di metodi analiticamente più sensibili e la possibilità di utilizzare PCT per il monitoraggio della terapia antibiotica, con temporizzazione di monitoraggio non

inferiore a 18-24 ore. In merito agli specifici biomarcatori, un analogo consenso di grado "B" è stato raggiunto per la determinazione di PCT e PCR, e per la determinazione dell'acido lattico. Sconsigliata invece l'esecuzione di altri biomarcatori, ad eccezione della presepsina, per la quale sussiste ancora una sostanziale incertezza a favore o contro.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* 2009;25:83-101.
2. Scott MC. Defining and diagnosing sepsis. *Emerg Med Clin N Am* 2017;35:1-9.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
4. Osler W. *The Evolution of Modern Medicine*. Yale University Press, 1913.
5. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;10:701-6.
6. Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2012;20:41.
7. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
8. Chamberlain DJ, Willis E, Clark R, et al. Identification of the severe sepsis patient at triage: a prospective analysis of the Australasian Triage Scale. *Emerg Med J* 2015;32:690-7.
9. Abraham E. New definitions for sepsis and septic shock. Continuing evolution but with much still to be done. *JAMA* 2016;315:757-9.
10. Churpek MM, Snyder A, Han X, et al. 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 Respir Crit Care Med* 2017;195:906-11.
11. Cortellaro F, Ferrari L, Molteni F, et al. Accuracy of point of care ultrasound to identify the source of infection in septic patients: a prospective study. *Intern Emerg Med* 2017;12:371-8.
12. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Engl J Med* 2017;376:2235-44.
13. Tamma PD, Avdic E, Li DX, et al. Association of adverse events with antibiotic use in hospitalized patients. *JAMA Intern Med* 2017;177:1308-15.
14. Schuetz P, Aujesky D, Müller C, et al. Biomarker-guided personalised emergency medicine for all - hope for another hype? *Swiss Med Wkly* 2015;145:w14079.
15. Lippi G, Favalaro EJ, Simundic AM. Biomedical research platforms and their influence on article submissions and journal rankings: an update. *Biochem Med (Zagreb)* 2012;22:7-14.
16. Istituto Superiore di Sanità. Manuale metodologico - Come produrre, diffondere e aggiornare raccomandazioni per la pratica clinica. http://www.snlg-iss.it/manuale_metodologico_SNLG. Ultimo accesso: maggio 2017.
17. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, et al. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2006;34:1996-2003.
18. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, et al. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:210-7.
19. Wu Y, Wang F, Fan X, et al. Accuracy of plasma sTREM-1 for sepsis diagnosis in systemic inflammatory patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2012;16:R229.
20. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013;13:426-35.
21. Lee SH, Chan RC, Wu JY, et al. Diagnostic value of procalcitonin for bacterial infection in elderly patients - a systemic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract* 2013;67:1350-7.
22. Hoebner SH, van der Geest PJ, Nieboer D, et al. The diagnostic accuracy of procalcitonin for bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:474-81.
23. Ren H, Li Y, Han C, et al. Serum procalcitonin as a diagnostic biomarker for sepsis in burned patients: a meta-analysis. *Burns* 2015;41:502-9.
24. Wang X, Li ZY, Zeng L, et al. Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Crit Care* 2015;19:245.
25. Wu J, Hu L, Zhang G, et al. Accuracy of presepsin in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0133057.
26. Tong X, Cao Y, Yu M, et al. Presepsin as a diagnostic marker for sepsis: evidence from a bivariate meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag* 2015;11:1027-33.
27. Chengfen Y, Tong L, Xinjing G, et al. Accuracy of procalcitonin for diagnosis of sepsis in adults: a Meta-analysis. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2015;27:743-9.
28. Zhang X, Liu D, Liu YN, et al. The accuracy of presepsin (sCD14-ST) for the diagnosis of sepsis in adults: a meta-analysis. *Crit Care* 2015;19:323.
29. Zhang J, Hu ZD, Song J, et al. Diagnostic value of presepsin for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e2158.
30. Zheng Z, Jiang L, Ye L, et al. The accuracy of presepsin for the diagnosis of sepsis from SIRS: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intensive Care* 2015;5:48.
31. Chen KF, Chaou CH, Jiang JY, et al. Diagnostic accuracy of lipopolysaccharide-binding protein as biomarker for sepsis in adult patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016;11:e0153188.
32. Ma L, Zhang H, Yin YL, et al. Role of interleukin-6 to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Cytokine* 2016;88:126-35.
33. Liu Y, Hou JH, Li Q, et al. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus* 2016;5:2091.
34. Ni W, Han Y, Zhao J, et al. Serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a biological marker of bacterial infection in adults: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:39481.
35. Cabral L, Afreixo V, Almeida L, et al. The use of procalcitonin (PCT) for diagnosis of sepsis in burn patients: a meta-analysis. *PLoS One* 2016;11:e0168475.
36. Yu Z, Liu J, Sun Q, et al. The accuracy of the procalcitonin test for the diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis* 2010;42:723-33.
37. Vouloumanou EK, Plessa E, Karageorgopoulos DE, et al. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2011;37:747-62.
38. Yuan H, Huang J, Lv B, et al. Diagnostic value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis.

- Biomed Res Int 2013;2013:520294.
39. Lv B, Huang J, Yuan H, et al. Tumor necrosis factor- α as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a meta-analysis. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:471463.
 40. Zhou M, Cheng S, Yu J, et al. Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0127170.
 41. Xu L, Li Q, Mo A, et al. Diagnostic value of C-reactive protein in neonatal sepsis: A meta-analysis. *Eur J Inflamm* 2016;14:100-8.
 42. Shi J, Tang J, Chen D. Meta-analysis of diagnostic accuracy of neutrophil CD64 for neonatal sepsis. *Ital J Pediatr* 2016;42:57.
 43. Pontrelli G, De Crescenzo F, Buzzetti R, et al. Accuracy of serum procalcitonin for the diagnosis of sepsis in neonates and children with systemic inflammatory syndrome: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017;17:302.
 44. Kopterides P, Siempos II, Tsangaris I, et al. Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med* 2010;38:2229-41.
 45. Heyland DK, Johnson AP, Reynolds SC, et al. Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in the critical care setting: a systematic review and an economic evaluation. *Crit Care Med* 2011;39:1792-9.
 46. Schuetz P, Chiappa V, Briel M, et al. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. *Arch Intern Med* 2011;171:1322-31.
 47. Soni NJ, Samson DJ, Galaydick JL, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Med* 2013;8:530-40.
 48. Prkno A, Wacker C, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock - a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2013;17:R291.
 49. Andriolo BN, Andriolo RB, Salomão R, et al. Effectiveness and safety of procalcitonin evaluation for reducing mortality in adults with sepsis, severe sepsis or septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;1:CD010959.
 50. Clerico A. Biomarkers for sepsis: an unfinished journey. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1135-8.
 51. Dipalo M, Guido L, Micca G, et al. Multicenter comparison of automated procalcitonin immunoassays. *Pract Lab Med* 2015;2:22-8.
 52. Markanday A. Acute phase reactants in infections: evidence-based review and a guide for clinicians. *Open Forum Infect Dis* 2015;2:ofv098.
 53. Chu DC, Mehta AB, Walkey AJ. Practice patterns and outcomes associated with procalcitonin use in critically ill patients with sepsis. *Clin Infect Dis* 2017;64:1509-15.
 54. Pezzati P, Balboni F, Piazzini T, et al. Procalcitonin and sepsis: hints on clinical appropriateness. *Biochim Clin* 2013;37:15-22.
 55. Di Somma S, Magrini L, Travaglino F, et al. Opinion paper on innovative approach of biomarkers for infectious diseases and sepsis management in the emergency department. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1167-75.

Determinazione delle immunoglobuline E specifiche

Diego Faggian¹, Ignazio Brusca², Barbara Cinti³, Beatrice Caruso⁴, Bruno Dente⁵, Maria Grazia Mazzarello⁶, Tiziana Scacchetti⁷ per il Gruppo di Studio SIBioC "Allergologia di Laboratorio"

¹U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

²U.O. di Patologia Clinica, P.O. Buccheri La Ferla, Palermo

³Laboratorio Analisi, A.O.U. Ospedali Riuniti, Ancona

⁴Laboratorio di Biochimica Clinica, Università di Verona

⁵U.O.C. Medicina di Laboratorio, P.O. San Paolo, Napoli

⁶Laboratorio Analisi, P.O. Novi Ligure (AL)

⁷Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale Sant'Agostino Estense-NOCSAE Baggiovara, Modena

ABSTRACT

SIBioC Position statement about *in vitro* immunoglobulin E (IgE) testing. The aim of this document is to contribute to increase the knowledge of the diagnostic significance and the clinical value of laboratory tests that are included in the *in vitro* category of allergy tests. In this context, the clinical benefits of the *in vitro* determination of specific immunoglobulins E (IgE) for complete extracts or single allergen molecules is to be strongly reaffirmed. This test is to be considered central in the diagnostic algorithm of allergic diseases compared to Skin Prick Test.

INTRODUZIONE

La valutazione dello stato di sensibilizzazione di un paziente sospetto di allergia, può essere effettuata con test cutanei *in vivo* o mediante test *in vitro* (1, 2, 3). I test cutanei più frequentemente utilizzati sono gli "Skin Prick Test" (SPT) (4, 5), mentre più raramente si ricorre ai test intradermici per la valutazione delle reazioni immediate o a test epicutanei da contatto ("Patch Test") per la valutazione delle reazioni ritardate cellulo-mediate. I test *in vitro* a loro volta comprendono numerose indagini di laboratorio effettuabili su sangue o su secrezioni.

Lo scopo del presente documento è fornire uno strumento utile per approfondire le conoscenze sul reale significato diagnostico e clinico dei principali esami di laboratorio che, a vario titolo, sono considerati nella categoria dei test allergologici *in vitro*. In tale contesto si ritiene utile rimarcare l'oggettiva utilità della determinazione delle immunoglobuline E (IgE) specifiche (sIgE), per gli estratti completi o per le singole molecole allergeniche, rimarcando la centralità di tale determinazione nell'algoritmo diagnostico delle allergopatie rispetto al SPT.

CENNI STORICI

Il termine allergia fu introdotto per la prima volta nel 1906 dal pediatra viennese von Pirquet per segnalare un'alterata reazione in un organismo ospite. Nel 1921 due ricercatori tedeschi, Prausnitz e Küstner, dimostrarono che l'allergia era correlata a un fattore sierico che successivamente fu definito "reagina". Nel 1923 Coca e Cooke usarono il termine atopia per definire la condizione costituzionale che predispone allo sviluppo di allergia. Infine, nel 1966-67 il gruppo di Ishizaka, a Denver nel Colorado, identificò nel siero dei soggetti atopici una proteina ancora sconosciuta della frazione gammaglobulinica con attività reaginica. Contemporaneamente in Svezia, altri due ricercatori, Bennich e Johansson, identificarono in un paziente con mieloma una nuova immunoglobulina definita IgND e successivamente rilevarono che questa molecola era presente in concentrazione elevata anche nel siero di soggetti atopici. Fu solo nel 1968 a Losanna che una commissione internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) decise di denominare ufficialmente e definitivamente questa immunoglobulina come IgE (6). Negli anni '70 del secolo scorso, furono

Corrispondenza a: Diego Faggian, U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, via Giustiniani 1, 35128 Padova. Tel. 0498218481, Fax 0498211290, E-mail diego.faggian@aopd.veneto.it

Ricevuto: 31.08.2017

Accettato: 22.09.2017

Pubblicato on-line: 02.02.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.010

introdotte in commercio le prime metodiche di laboratorio per la determinazione delle IgE da parte dell'azienda svedese Pharmacia: il "Paper Radio Immuno Sorbent Test" (PRIST) per la misura delle IgE totali sieriche e il "Radio Allergo Sorbent Test" (RAST) per la misura delle sIgE, cioè orientate verso uno specifico allergene. La scoperta delle IgE ha aperto la strada alla comprensione dei meccanismi delle manifestazioni allergiche e, di conseguenza, allo sviluppo di tecniche diagnostiche e alla standardizzazione degli estratti allergenici. In anni recenti le conoscenze relative a reazioni allergiche non IgE-mediate hanno consentito di acquisire altre metodiche diagnostiche, talvolta utilizzabili nella pratica clinica (7).

La diagnostica delle allergie *in vitro* si avvale sia di test specifici (volti a evidenziare le sensibilizzazioni allergiche) che di test aspecifici (volti a misurare la produzione di IgE totali e/o la flogosi allergica) (8).

TEST SPECIFICI

Queste indagini sono considerate di supporto alla clinica. Si tratta prevalentemente di determinazioni quantitative e standardizzate, che presentano una accettabile affidabilità clinica. Nondimeno, richiedono tempi di risposta più lunghi rispetto agli SPT. Rientrano in questo gruppo la determinazione delle sIgE per estratti completi o componenti molecolari di allergeni, test di screening per atopia, la determinazione di marcatori di membrana cellulari legati all'attivazione dei basofili (9, 10).

TEST ASPECIFICI

Sono anche questi esami di laboratorio quantitativi, alcuni dei quali di facile esecuzione come ad esempio la conta degli eosinofili nasali, che può essere eseguita anche nell'ambulatorio pediatrico. Comprendono la determinazione delle IgE sieriche totali, la determinazione della triptasi, la conta degli eosinofili circolanti nel sangue e nelle secrezioni mucose, la determinazione dei mediatori della flogosi eosinofila. Per quanto riguarda la determinazione dell'istamina, nonostante le premesse teoriche, la sua utilità clinica è inficiata dalla breve emivita di questo mediatore chimico, per cui è utilizzata prevalentemente a scopo di ricerca.

In questo documento si tratterà principalmente delle metodiche *in vitro* volte alla determinazione delle sIgE.

DETERMINAZIONE DELLE IgE SPECIFICHE

La ricerca delle sIgE dirette contro un determinato allergene rimane il più utile tra i test di laboratorio per la diagnosi delle malattie allergiche da ipersensibilità immediata. Si basa su metodiche immunologiche, modificate continuamente negli ultimi anni a partire dal RAST, primo ad essere introdotto nella diagnostica clinica.

La determinazione delle sIgE su siero si basa su varianti applicative del metodo ELISA. In una variante, il

campione del paziente è incubato con una fase solida alla quale è stata adesa e immobilizzata una preparazione di allergeni che a loro volta legano e catturano gli specifici anticorpi IgE eventualmente presenti nel siero del paziente. La reazione prosegue con l'aggiunta di un coniugato enzimatico, costituito da un anticorpo monoclonale che riconosce specificamente gli anticorpi IgE e un enzima in grado di trasformare un substrato generando così un segnale facilmente quantificabile. Il segnale è direttamente proporzionale alla concentrazione delle sIgE verso l'allergene ricercato, eventualmente presente nel campione, ed è utilizzata come parametro per la determinazione quantitativa delle stesse IgE allergene-specifiche. In una seconda variante di questa tecnica, anticorpi IgE presenti nel siero del paziente sono dapprima catturati e immobilizzati, e successivamente cimentati con gli antigeni marcati. A questo processo segue, come nel caso precedente, la rilevazione e successiva determinazione quantitativa. In un terzo tipo di tecnica, gli anticorpi IgE del paziente sono complessati in fase liquida con antigeni marcati. Il complesso allergene-anticorpo è quindi catturato mediante la marcatura dell'antigene. La rilevazione avviene poi utilizzando un coniugato enzimatico che riconosce genericamente gli anticorpi IgE (11). In tutti e tre i casi sono utilizzate curve di calibrazione realizzate con standard a titolo noto riferito al 2° International Reference Preparation WHO 75/502 (12) per le IgE umane. Recentemente è stata implementata una calibrazione aggiornata contro il 3° International Standard WHO 11/234, espressa in unità quantitative kUa/L (13). I risultati ottenuti sono quindi rapportati a tali curve di calibrazione onde generare un risultato quantitativo (14-17).

La quantificazione del segnale appare particolarmente importante dal punto di vista clinico: per quanto riguarda le allergie alimentari è stata dimostrata una stretta correlazione tra concentrazione di sIgE e probabilità di reazione allergica dopo test orale, soprattutto per alcuni alimenti allergenici tra i quali arachidi, latte, uova e pesce (18). Per quanto riguarda le allergie respiratorie, la determinazione quantitativa di sIgE è premessa estremamente importante nel selezionare i pazienti da sottoporre a immunoterapia. E' comunque necessario usare sempre cautela nell'interpretazione del risultato quantitativo, poiché in alcuni casi si possono osservare elevati valori di sIgE in soggetti che non hanno mai mostrato una reazione avversa. Contestualmente, è possibile osservare importanti reazioni cliniche in soggetti con bassi valori di sIgE. I parametri di qualità richiesti per la determinazione delle sIgE (a prescindere da quale dei tre metodi sia utilizzato) si basano sulla specificità delle molecole di anticorpi utilizzate, sull'assenza di legami aspecifici, sul livello di segnale di fondo ("background"), sul controllo dell'interferenza da parte di anticorpi di classe IgG, sulla linearità di diluizione del campione, sull'imprecisione nella serie, e quindi sulla precisione analitica generale del sistema in uso (19). Se questi parametri sono

mantenuti sotto controllo, la determinazione degli anticorpi IgE-specifici è particolarmente utile. Questi anticorpi sono presenti nella gran parte dei pazienti con allergia clinicamente manifesta, e la loro assenza può essere utilizzata con una certa affidabilità per escludere la sensibilizzazione nei confronti dell'allergene testato. Numerose pubblicazioni dimostrano che la determinazione delle sIgE è il miglior indicatore oggi disponibile nella pratica clinica per la diagnosi delle allergie oltre ad essere diffusamente utilizzata nella pratica clinica. L'allergia è un disordine progressivo, in cui la sensibilizzazione rappresenta lo stadio precoce, mentre la comparsa dei sintomi di malattia rappresenta lo stadio successivo. Ne consegue che la presenza di una sensibilizzazione individuabile con esami di laboratorio può essere rilevata in pazienti che ancora non hanno manifestato i segni clinici dell'allergia. Al contrario, nello stadio avanzato della malattia possono essere generati anticorpi specifici contro strutture raramente coinvolte nello scatenamento dei sintomi allergici. Da questa prospettiva, la determinazione delle sIgE può essere utilizzata per stabilire la presenza di sensibilizzazione anche in assenza di sintomatologia clinica. Si tratta quindi di un dato assai utile e potenzialmente idoneo per individuare tempestivamente la presenza di sensibilizzazione.

La determinazione delle sIgE presenta però anche limiti caratteristici, in larga parte attribuibili alla presenza di cross-reattività talvolta difficilmente interpretabili dal punto di vista clinico. Un ulteriore limite è rappresentato dal fatto che gli estratti alimentari utilizzati per la produzione di alcuni allergeni sono instabili e/o presenti in quantità basse, generando così il rischio di risultati falsamente negativi. La continua ricerca in questo settore ha comunque prodotto un costante miglioramento di questi preparati, ed essi presentano una qualità, in termini di completezza allergenica e stabilità, notevolmente superiore agli estratti allergenici per lo SPT. In definitiva, soprattutto nella diagnosi di allergia alimentare, la determinazione delle sIgE gode di un valore predittivo negativo superiore rispetto ai test cutanei.

Le nuove possibilità offerte dalla tecnologia consentono di studiare e isolare allergeni sotto-rappresentati, a partire da un ampio ventaglio di fonti differenti. La possibilità di utilizzare direttamente le molecole allergeniche ottenute anche con le tecnologie ricombinanti supera le problematiche relative alla ridotta concentrazione e instabilità degli allergeni ricavati dagli estratti naturali.

Un allergene sintetico o ricombinante è una molecola frutto delle moderne biotecnologie che rendono possibile l'identificazione prima, e la riproduzione poi, di proteine specifiche da un estratto allergenico (20). La maggior parte degli allergeni ricombinanti è espressa in *Escherichia coli* e ha caratteristiche epitopiche generalmente paragonabili alle molecole naturali, sia dal punto di vista strutturale, sia per quanto concerne la sequenza degli aminoacidi (struttura proteica primaria). La designazione delle molecole allergeniche è stabilita

secondo una nomenclatura ufficiale dell'International Union of Immunological Societies (IUIS) (www.allergen.org), sottocomitato del WHO, e rispecchia fedelmente la classificazione binomiale di C. Limneo in latino. Essi sono raggruppati secondo le loro funzioni biochimiche. Comprendono pertanto gruppi di proteine strutturali, proteine regolatorie, proteine di riserva, proteine patogenesi-relative (proteine PR), e così via. Una migliore comprensione dell'epidemiologia delle allergie mediante analisi *in vitro* con allergeni ricombinanti consente di studiare fenomeni complessi quali differenze nella reattività clinica in funzione dell'area geografica o l'esistenza di reazioni crociate tra fonti allergeniche apparentemente divergenti. Più concretamente, le possibilità offerte dalla determinazione delle sIgE con allergeni ricombinanti per evidenziare profili di sensibilizzazione, consentono di spiegare perché nel Nord e Centro Europa i sintomi caratteristici di un'allergia da frutta e verdura sono spesso orali, mentre i pazienti del Sud Europa presentano più frequentemente sintomi sistemici (21). Lo studio di questi profili, in realtà, dimostra che la sensibilizzazione al Bet v 1 (l'allergene maggiore della betulla) domina nel Nord Europa, indirizzando la sensibilizzazione verso la reattività a omologhi di questa proteina presenti in altre specie, mentre nelle regioni mediterranee dominano le sensibilizzazioni alle proteine responsabili del trasferimento di lipidi ["Lipid Transfer Proteins" (LTP)] con una predominanza di vere allergie alimentari.

Gli allergeni ricombinanti aprono nuovi campi di studio e offrono informazioni finora inaccessibili, soprattutto per la determinazione di profili di reattività e nell'analisi di reazioni crociate. Questo è quanto accade, per esempio, per una fonte allergenica come il polline di graminacee, in cui essi permettono di identificare precisamente gli allergeni molecolari responsabili dei sintomi. Infatti, durante la stagione pollinica, i pazienti con allergia alle graminacee sono esposti contemporaneamente a diversi allergeni di varie specie tassonomicamente vicine (almeno 10), ma tra loro differenti. Tuttavia, non tutte le graminacee, come ad esempio la Codolina (*Phleum Pratense*), rilasciano il loro polline nel picco pollinico, che corrisponde al picco sintomatico (22).

Le differenti specie tassonomiche, pur avendo una struttura aminoacidica e morfologica simile, inducono una produzione abbastanza differenziata di sIgE monomolecolari che possono essere riconosciute attraverso la diagnostica molecolare, permettendo così una valutazione precisa e personalizzata nell'ambito dell'immunoterapia specifica.

Nel caso di piante tassonomicamente vicine che impollinano durante lo stesso periodo, la diagnostica molecolare consente anche di distinguere la fonte allergenica realmente responsabile dei sintomi (23). Mediante analisi degli allergeni ricombinanti, è possibile identificare le proteine in grado di indurre reattività primaria specifica e quelle invece responsabili di reattività crociata, onde guidare la gestione terapeutica

del paziente, soprattutto nell'ambito delle immuno terapie specifiche (ITS) (24-26). Utilizzando la determinazione delle sIgE per allergeni molecolari in associazione con allergeni tradizionali è possibile ottenere profili di reattività che consentono di comprendere meglio l'origine delle reazioni e analizzare le potenziali interazioni eterospecifiche. È inoltre possibile determinare il profilo di sensibilizzazione prima di un trattamento ITS, onde valutare se le reazioni allergiche del paziente siano realmente causate dalla sensibilizzazione verso i marcatori molecolari primari (per esempio il Phleum p1 nel polline di graminacea). In questo caso è molto probabile che il paziente risponda meglio all'immunoterapia, giacché l'estratto del vaccino contiene una quantità adeguata e controllata dell'allergene primario.

Se fino a poco tempo fa, infatti, era possibile definire genericamente un paziente come allergico ad un polline o ad un alimento, ora è possibile definirne l'allergogramma monomolecolare attraverso la "component resolved diagnosis" (CRD) (20, 26).

La CRD consente di identificare il reale fattore scatenante di una reazione allergica a livello molecolare, discriminare tra paziente mono e polisensibile, spiegare i sintomi causati da cross-reazioni e identificare il giusto paziente per la giusta ITS.

Nelle allergie alimentari complesse, la CRD consente inoltre di valutare il rischio e la gravità di una reazione allergica, di ridurre la necessità del Test di Provocazione Orale, di evitare diete non necessarie (suggerendo per esempio che un particolare cibo deve essere solo ben cotto) di identificare il giusto paziente per l'appropriato uso di adrenalina e di smascherare false positività dovute a cross-reattività da panallergeni (ad es., profilina Hev b8 come unica positività verso il lattice K82).

Ci si aspetta ovviamente che gli allergeni ricombinanti possano essere utilizzati, oltre che per la diagnosi, anche per realizzare immunoterapie mirate volte a ridurre il tasso di allergenicità del farmaco a parità di immunogenicità. A ciò si aggiunge il fatto che i sistemi di ultima generazione sono dotati di sensibilità, specificità e riproducibilità superiori, grazie anche alla maggiore automazione e all'impiego di parametri standard internazionali di riferimento.

I test *in vitro* sono generalmente più sensibili, specie per allergeni alimentari. Nell'allergia respiratoria è stato osservato che la determinazione delle sIgE con metodiche di ultima generazione può fornire risultati correlabili in termini qualitativi, ma decisamente più accurati in termini quantitativi, rispetto allo SPT, il quale presenta maggiori problemi di standardizzazione degli estratti. A questi si sommano i ben noti problemi derivanti dalla soggettività dell'interpretazione, dall'interferenza della terapia in uso e dall'impossibilità di esecuzione in presenza di dermatiti. Gli SPT rappresentano ancora oggi uno dei migliori esempi di point of care testing, ma non possono essere considerati test conclusivi od omnicomprensivi nell'algoritmo diagnostico delle allergopatie.

I test *in vitro* presentano caratteristiche di

standardizzazione e completezza diagnostica superiori a quella dei test cutanei (2, 3), e sono effettivamente da considerare il vero "gold standard" diagnostico negli studi clinici, malgrado questo ruolo rimanga ancora di pertinenza dello SPT in numerosi studi.

CONCLUSIONI

Alla luce di quanto descritto, il gruppo di studio SiBioC-Medicina di Laboratorio per l'Allergologia *in vitro* ripropone la necessità di considerare la determinazione *in vitro* delle sIgE come esame di I livello, e non succedaneo allo SPT. Il Gruppo di studio si ripropone inoltre di organizzare nel futuro una serie di incontri in cui si enfatizzi ulteriormente l'importanza della determinazione delle sIgE, anche alla luce della continua implementazione di nuovi allergeni ricombinanti per la diagnostica molecolare.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Johansson SGO. ImmunoCAP Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Exp Rev Mol Diagn* 2004;4:273-9.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. I/LA 20. Analytical Performance Characteristics, Quality Assurance, and Clinical Utility of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E Antibodies of Defined Allergen Specificities, 3rd ed. October 2016. <https://clsi.org/standards/products/immunology-and-ligand-assay/documents/ila20/> (Ultimo accesso: Dicembre 2017)
3. Clinical and Laboratory Standard Institute. I/LA 37. Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies and Defined Allergen Specificities, Approved Guideline, 1st ed. October 2016. <https://clsi.org/standards/products/immunology-and-ligand-assay/documents/ila37/> (Ultimo accesso: Dicembre 2017)
4. Johansson SG, Yman L. In vitro assay for immunoglobulin E, methodology, indications, and interpretation. *Clin Rev Allergy* 1988;6:93-139.
5. Jongkonnee W, Narissara S, Sadudee B, et al. Comparison of specific IgE detection by immunoblotting and fluorescence enzyme assay with in vivo skin prick test. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2017. doi: 10.12932/AP-270217-0035.
6. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SGO, et al. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull World Health Organ* 1968;38:151-2.
7. Plebani M, Borghesan F, Faggian D. Clinical efficiency of in vitro and vivo tests for allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:23-8.
8. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of NIAID-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:S1-S58.
9. Carroccio A, Brusca I, Mansueto P, et al. A comparison between two different in vitro basophil activation tests for

- gluten- and cow's milk protein sensitivity in irritable bowel syndrome (IBS)-like patients. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1257-63.
10. Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1077-84.
 11. Paganelli R, Ansotegui IJ, Sastre J, et al. Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease – clinical evaluation of a new in vitro test system, UniCAP, in six european allergy clinics. *Allergy* 1998;53:763-8.
 12. van Ree R. Analytic aspects of the standardization of allergenic extracts. *Allergy* 1997;52:795-805.
 13. Expert Committee on Biological Standardisation The 3rd International Standard for serum IgE, WHO/BS/ 2013.2220.
 14. Williams PB. Usefulness of specific IgE antibody tests: a progress report. *Ann Allerg Asthma Immunol* 2003;91:518-24.
 15. Faggian D. Valutazione del sistema UNICAP 1000 per il dosaggio delle IgE specifiche in completa automazione. *Biochim Clin* 2004;28:337-44.
 16. Yman L. Standardization of in vitro methods. *Allergy* 2001;56(Suppl. 67):70-4.
 17. Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, et al. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut* 2004;53:1459-64.
 18. Liccardi G, Mazzarello MG, Senna G, et al. The degree of serological sensitization to cat allergen in patients with or without cat at home. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2005;37:87-9.
 19. Valenta R, Duchene M, Vrtala S, et al. Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:889-94.
 20. Shek LPC, Bardina L, Castro R, et al. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 2005;60:912-19.
 21. Frenguelli F, Bonini S, Fiocchi A, et al. Bridging allergologic and botanical knowledge in seasonal allergy: a role for phenology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;105:223-7.
 22. Cox LS, Casale TB, Nayak AS, et al. Clinical efficacy of 300IR 5-grass pollen sublingual tablet in a US study: the importance of allergen-specific serum IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1327-34.
 23. Moverare R, Elfman L, Vesterinen E, et al. Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System™. *Allergy* 2002;57:423-30.
 24. Duran-Tauleria E, Vignati G, Guedan MJA, et al. The utility of specific immunoglobulin E measurements in primary care. *Allergy* 2004;59:35-41.
 25. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S, et al. Molecular profiles of IgE to *Phleum pratense* in children with grass pollen allergy: implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:834-9.
 26. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:891-6.

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

Ilenia Infusino^{1,2}, Concetta Timpanaro², Dominika Szöke², Mauro Panteghini^{1,2}

¹Centro di Ricerca per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università di Milano

²UOC Patologia Clinica, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano

Caro Editore,

L'inibitore della C1 esterasi (C1-INH) è una proteina polimorfica altamente glicosilata che appartiene alla famiglia serpinica degli inibitori delle proteasi, la cui funzione principale è quella di inibire il sistema del complemento per prevenirne l'attivazione spontanea. Inoltre, attraverso il controllo del rilascio di bradichinina nell'organismo, C1-INH è in grado di regolare l'attivazione dei mediatori della permeabilità vascolare (1). La carenza di C1-INH si riscontra in due differenti forme di angioedema (AE): l'AE ereditario (C1-INH-HAE) e quello acquisito (C1-INH-AAE), suddivisi, rispettivamente, in 4 e 3 tipologie secondo quanto stabilito nel corso di una "Consensus Conference" organizzata nel 2012 dall'Accademia Europea di Allergia e Immunologia Clinica (2).

Il C1-INH-HAE è dovuto a mutazioni in uno dei due alleli del gene *C1-INH*, chiamato anche *SERPING1*, localizzato sul cromosoma 11, e si manifesta clinicamente con edemi localizzati e ricorrenti sottocutanei o della sottomucosa della durata di 2-5 giorni. I distretti anatomici comunemente più colpiti sono cute, vie aeree superiori e tratto gastrointestinale (3). La natura acquisita del C1-INH-AAE implica invece che nessuna mutazione nel gene *C1-INH* e nessuna storia familiare di AE possano essere associati a questa forma della malattia. Il consumo di C1-INH e di altri componenti della via classica del complemento, il rilascio di bradichinina e la presenza di auto-anticorpi che inattivano la funzione del C1-INH, andando a legare specifici epitopi del sito attivo, sono responsabili di questa forma di AE. Il C1-INH-AAE coinvolge prevalentemente viso, lingua, ugola e le vie aeree superiori, mentre gli interessamenti del tratto gastrointestinale sono meno comuni (4).

Le forme di AE dovute a carenza del C1-INH possono essere diagnosticate con le determinazioni nel plasma degli individui sospetti dei fattori C4 e C1q del sistema del complemento, di concentrazione e attività enzimatica di C1-INH e degli anticorpi anti-C1-INH (5, 6). La concentrazione di C4 è ridotta in entrambe le forme di AE, anche se concentrazioni inferiori al 50% dei livelli fisiologici sono più frequenti nel C1-INH-HAE. In questo tipo di AE si riscontrano inoltre una bassa attività e basse concentrazioni proteiche di C1-INH, una concentrazione nei limiti fisiologici di C1q e l'assenza di auto-anticorpi anti-C1-INH. Nel C1-INH-AAE, anch'esso caratterizzato da una diminuzione delle concentrazioni di C1-INH, misurate sia come attività enzimatica che come massa proteica, la concentrazione di C1q risulta invece ridotta e possono essere rilevati gli auto-anticorpi anti-C1-INH. La misura della concentrazione di C1-INH svolge quindi un ruolo fondamentale nella diagnosi degli AE da carenza di C1-INH, ma è anche importante nel monitoraggio dei soggetti carenti trattati farmacologicamente con i derivati plasmatici o ricombinanti di C1-INH (7).

The Binding Site ha reso recentemente disponibile un metodo immunoturbidimetrico per la misura delle concentrazioni sieriche di C1-INH da applicare sull'analizzatore Optilite. In questo lavoro abbiamo valutato questo nuovo sistema di misura confrontandolo con il metodo immunoturbidimetrico in uso nel nostro laboratorio (Sentinel Ch) implementato su analizzatore AU480 (Beckman Coulter). Durante lo studio, i due sistemi sono stati utilizzati in maniera strettamente aderente alle raccomandazioni dei rispettivi produttori, i quali dichiarano che i calibratori sono rispettivamente riferibili a uno standard interno (metodo The Binding Site) e alla "Reference Preparation for Serum Proteins Lot 3" (RPSP-3) del "College of American Pathologists" (CAP) (metodo Sentinel). L'imprecisione del metodo Sentinel è stata stimata misurando un materiale di controllo liquido-congelato (BioRad Liquichek Unassayed Chemistry Control Level 2) per un periodo di 10 mesi, mentre quella del metodo The Binding Site è stata valutata misurando un pool di sieri congelato in sedute di lavoro svolte in due mesi consecutivi. Lo studio di comparazione è stato condotto analizzando 27 campioni di siero (conservati in congelatore fino al momento delle misurazioni), di cui

Corrispondenza a: Ilenia Infusino, UOC Patologia Clinica, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Via GB Grassi 74, 20157 Milano. Tel. 0239042745, fax 0250319835, e-mail infusino.ilenia@asst-fbf-sacco.it

Ricevuto: 17.11.2017

Revisionato: 24.11.2017

Accettato: 27.11.2017

Pubblicato on-line: 15.01.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.002

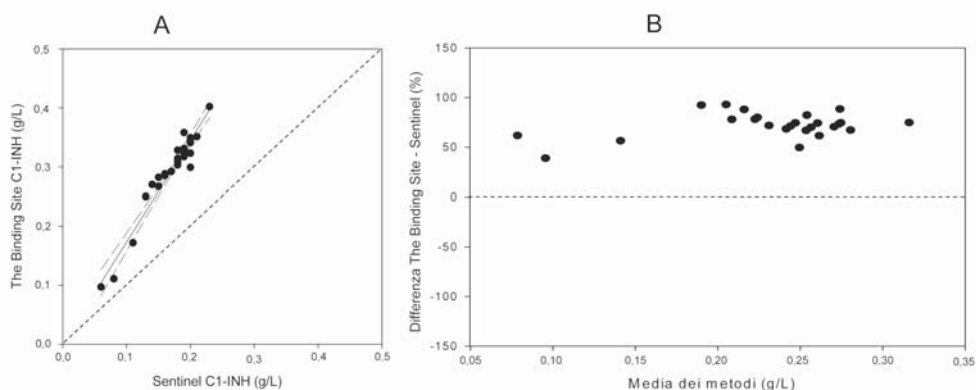


Figura 1

Confronto tra metodi (A) e grafico delle differenze in percentuale dei risultati della concentrazione (B) dell'inibitore C1 esterasi (C1-INH) nel siero ottenuti con i metodi Sentinel AU480 e The Binding Site Optilite. Nel confronto tra metodi (A), le linee a tratteggio lungo rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% della regressione, mentre la linea a tratteggio corto identifica la retta $y = x$.

due da soggetti con totale carenza di C1-INH. Poiché nessuno dei metodi valutati è da considerarsi come riferimento, per il confronto tra metodi è stata utilizzata l'analisi della regressione secondo Deming (8).

L'imprecisione (CV totale sul periodo valutato) era 4,2% (media, 0,17 g/L; n=144) per il metodo Sentinel AU480 e 2,8% (media, 0,31 g/L; n=25) per il metodo The Binding Site Optilite. Il confronto tra metodi ha evidenziato uno scostamento proporzionale tra i metodi molto significativo ($P < 0,0001$) [retta di regressione: Optilite = 1,81 [intervallo di confidenza al 95% (IC): 1,61-2,01] Sentinel -0,01 (IC: -0,05/0,02)], con differenze medie, assoluta e relativa, rispettivamente, di 0,12 g/L (IC: 0,109-0,137) e 72,2% (IC: 67,3-77,1) (Figura 1). Esisteva, tuttavia, una buona correlazione nei risultati ($R^2=0,938$), essendo entrambi i metodi anche in grado di evidenziare l'indosabilità di C1-INH nei due campioni ottenuti da soggetti completamente carenti. I dati ottenuti evidenziano quindi la totale assenza di equivalenza dei valori di C1-INH ottenuti con i due metodi, nonostante questi abbiano mostrato identica selettività analitica per la proteina, testimoniata dall'intercetta ottenuta nella correlazione, non significativamente diversa da zero. È possibile spiegare questi risultati con la riferibilità della calibrazione dei due sistemi di misura a due diversi materiali, come dichiarato nelle specifiche tecniche dai due produttori.

Le attività di standardizzazione della misura delle proteine plasmatiche sono forse l'esempio più longevo di questo tipo di approccio nel campo della Medicina di Laboratorio (9). In particolare, per le più comuni proteine plasmatiche, la preparazione di materiali di riferimento parte da lontano, quando negli anni '70 venne rilasciata la "US National Reference Preparation" (USNRP), che di fatto ancora oggi costituisce il materiale di riferimento primario per 8 proteine (10). In questo campo, il CAP ha svolto un'attività parallela, che ha portato negli anni '80 a produrre vari lotti di "Reference Preparation for Serum Proteins" (RPSP), utilizzati come materiali di calibrazione da numerose ditte. Del RPSP sono stati prodotti nel tempo 4 lotti, con i valori ogni volta assegnati per trasferimento dal lotto precedente, ma in nessuno, a nostra conoscenza, è stato certificato il valore di C1-INH. Non si capisce quindi come Sentinel possa dichiarare per la sua procedura C1-INH la riferibilità al RPSP-3. Attualmente per le proteine plasmatiche è disponibile il materiale di riferimento ERM-DA470k/IFCC, ma purtroppo, ancora una volta, il C1-INH non è stato incluso nel gruppo delle proteine certificate (11). Da parte sua, la WHO ha reso disponibile nel 2010 lo standard internazionale NIBSC 08/262 per promuovere l'armonizzazione della misura dell'attività enzimatica del C1-INH, ma senza assegnare valori di concentrazione proteica (12). Quindi, in assenza di materiali di riferimento disponibili, la strada scelta dalla maggior parte dei produttori dei sistemi di misura della proteina C1-INH è stata quella di creare una gerarchia di calibrazione interna, che al massimo dimostri un'armonizzazione con un sistema di misura già commercializzato, come richiesto dalla "Food and Drug Administration" americana e perseguito da The Binding Site per i suoi prodotti (13). È evidente quindi l'urgenza di sforzi, da parte delle organizzazioni internazionali preposte, orientati a standardizzare i risultati delle misure delle concentrazioni di questa proteina, in considerazione del loro impatto clinico e della rilevanza nella diagnosi e nel monitoraggio dell'AE. Fino ad allora, sarà assolutamente indispensabile da parte del laboratorio porre attenzione alla metodo-dipendenza dei risultati ed adeguare di conseguenza gli intervalli di riferimento al metodo utilizzato.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Reddy Y, Siedlecki AM, Francis JM. Breaking down the complement system: a review and update on novel therapies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2017;26:123–8.
2. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy* 2014;69:602–16.
3. <https://www.osservatoriomalattiaare.it/angioedema-ereditario/6371-angioedema-classificazione-diagnosi-e-terapia-la-consensus-internazionale> (ultimo accesso: ottobre 2017).
4. Zanichelli A, Azin GM, Wu MA, et al. Diagnosis, course, and management of angioedema in patients with acquired C1-inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017;5:1307-13.
5. Farkas H, Veszeli N, Kajdácsi E, et al. “Nuts and bolts” of laboratory evaluation of angioedema. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2016;51:140–51.
6. Csuka D, Veszeli N, Varga L, et al. The role of the complement system in hereditary angioedema. *Molecular Immunology* 2017;89:59–68.
7. Mansi M, Wu MA, Zanichelli A, et al. Angioedema e ruolo delle bradichinine: nuovi trattamenti e coinvolgimento nei pazienti con scompenso cardiaco. *G Ital Cardiol* 2016;17:966-72.
8. Martin RF. General Deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies. *Clin Chem* 2000;46:100-4.
9. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem* 1994;40:934-8.
10. Merlini G, Blirup-Jensen S, Johnson AM, et al. Standardizing plasma protein measurements worldwide: a challenging enterprise. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1567–75.
11. Zegers I, Keller T, Schreiber W, et al. Characterization of the new serum protein reference material ERM-DA470k/IFCC: Value assignment by immunoassay. *Clin Chem* 2010;56:1880–8.
12. Thelwell C, Riggs P, Longstaff C on behalf of the ISTH-SSC Subcommittee on Factor XI and the Contact System. An international collaborative study to establish the WHO 1st international standards for C1-inhibitor, plasma and concentrate. *J Thromb Haemost* 2011;9:2097–9.
13. 510(k) substantial equivalence determination. Decision summary assay only template. www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K122304.pdf

In ricordo di Giovanni Ceriotti

Abbiamo appreso in questi giorni la scomparsa di Giovanni Ceriotti, un vero padre della Medicina di Laboratorio in Italia come Scienza e come pratica, togliendola dagli scantinati degli Ospedali e delle Cliniche Universitarie e promuovendo la sua essenza vera come Scienza e Pratica di laboratorio ben distinta nella sua intrinseca ratio, oltre che nella realtà operativa, dalla Medicina Clinica. Tuttavia, in questa autonoma riflessione e valorizzazione della disciplina, fin dal principio la finalità medica è sempre rimasta il driver della disciplina, cioè il contributo sempre più rilevante rivolto all'indirizzo diagnostico che il laboratorio aveva, e doveva sempre più acquisire, tra i segni che la Semeiotica Medica avesse per collaborare al meglio a fornire alla Medicina Clinica.

Giovanni Ceriotti è stato anche un ottimo e valoroso docente, oltre che con la parola precisa e accattivante, anche con libri sulla Chimica e Biochimica Clinica, nonché apportando rigore scientifico e metodologico attraverso il "*Giornale Italiano di Chimica Clinica*" che diventò presto un esempio di contributo importante alla scienza internazionale sia pure in lingua italiana. Contribuì a fondare la Società —a mio avviso— più importante nella Medicina di Laboratorio, la SIBioC, di cui fu padre e nume tutelare per tantissimi anni, contribuendo con il suo emblematico esempio e i suoi contributi illuminati a spianare la strada per le realizzazioni che tanto ora la illustrano.

A livello internazionale contribuì con pochi altri a portare l'Italia alle frontiere della conoscenza e all'interazione sempre maggiore che oggi hanno determinato, tanto per citare un esempio dei più rilevanti, ad occupare per studiosi italiani contemporaneamente la Presidenza e il Segretariato generale della IFCC, la organizzazione mondiale più importante della Medicina di laboratorio nel Mondo.

Seguire i suoi passi sarà per gli studiosi giovani e meno giovani un viatico importante per il successo di una branca sempre più rilevante per la Scienza e la Cultura operativa medica.

Francesco Salvatore



Giovanni Ceriotti in una foto del 1978.

Il ricordo di un Maestro del laboratorio clinico: Giovanni Ceriotti

Ho conosciuto Il Professor Giovanni Ceriotti mentre frequentavo il terzo anno del corso di laurea in Medicina a Padova nel 1972, e avevo chiesto di frequentare il laboratorio che dirigeva su suggerimento del suo aiuto, il Professor Pierangelo Bonini che mi aveva prospettato uno sbocco professionale "sicuro". Non avevo idea, e nessun studente di medicina al terzo anno di corso aveva una vaga idea di cosa fosse un laboratorio clinico e nemmeno era chiaro il valore dell'informazione di laboratorio, ma avevo curiosità e molte aspettative.

Il giorno che mi presentai all'appuntamento con Ceriotti, venni a sapere che Bonini si era trasferito ad Aosta dopo aver vinto il primariato in quella città e quindi mi ritrovai a gestire il colloquio senza chi mi doveva introdurre e presentare. Il Professor Ceriotti esordì chiedendomi quali fossero stati i voti negli esami di chimica, fisica, e biochimica con una certa severità, anche se con molta educazione. Fortunatamente, avevo portato con me il libretto e i voti erano buoni. Subito dopo questa richiesta, iniziai a spiegarmi quale sarebbe stata la ricerca che voleva affidarmi sul ruolo della LCAT (lecitin colesterol-aciltransferasi), e mi consegnò un plico di lavori della letteratura, tutti in lingua inglese, chiedendomi di leggerli e di relazionare a lui dopo 15 giorni. Passai il fine settimana a studiare con molta fatica i lavori senza comprendere che Ceriotti voleva che approfondissi la conoscenza dei metodi di determinazione dell'enzima, mentre io mi concentravo sul significato clinico dell'esame. Dopo 15 giorni, però, la discussione sulla LCAT fu molto breve perché il Professor Ceriotti aveva preso coscienza che tutti i metodi erano complessi, utilizzavano radioisotopi e quindi mi deviò su un altro tema, un metodo enzimatico per la determinazione dell'ammonio e mi affiancò a un chimico che frequentava il laboratorio. Ancor oggi, credo sia stata una delle metodiche più ostiche e difficili che abbia mai visto e ancor più difficile per un laureando in medicina, ma la vita del laboratorio clinico e la figura del Professor Ceriotti mi affascinarono al punto da continuare la frequenza, prendere la tesi e laurearmi con lui, anche se mi resi presto conto di essere il primo medico che seguiva quel percorso. La mia tesi di laurea fu sul ruolo dell'aggiunta del piridossal fosfato nella determinazione delle transaminasi, una ricerca che divenne il primo lavoro scientifico pubblicato come primo autore assieme al Professore. Mi specializzai con il Professor Ceriotti nella Scuola di Specializzazione, che era allora diretta dal Professor Siliprandi, e continuai la mia carriera con lui in un rapporto ricco di affetto, stima e qualche momento di convivialità.

Giovanni Ceriotti è stato un pioniere della Medicina di Laboratorio, uno scienziato capace di sviluppare e pubblicare metodi originali che hanno ricevuto grande attenzione dalla letteratura non solo del settore del laboratorio clinico. Per moltissimi anni, il metodo per la determinazione del DNA da lui sviluppato e pubblicato nel 1952 sul *Journal of Biological Chemistry*, è stato uno dei lavori più citati nella letteratura tanto da far entrare Giovanni Ceriotti nella prestigiosa *Who's Who* in un'epoca in cui PubMed e altri motori di ricerca ancora non esistevano¹. Ma sono molti altri gli apporti originali, dai metodi per la determinazione del glucosio con l'o-toluidina, a uno dei primi metodi enzimatici per la determinazione della creatinina, ai metodi per la determinazione della ornitina carbamiltransferasi, la catalasi e molti altri enzimi, come pure il metodo per la determinazione del ferro, pubblicato su *Clinical Chemistry* assieme al figlio Ferruccio nel 1980.

Ma Giovanni Ceriotti era soprattutto una mente eclettica capace di spaziare dalla "invenzione" di un particolare tipo di micropipetta che fabbricava in casa a Busto Arsizio assieme al suocero, allo studio di antitumorali come la narciclasina, o di tematiche microbiologiche alle quali ha lavorato anche dopo il pensionamento, nel laboratorio che aveva messo in piedi a casa. La sua conoscenza della chimica e della biochimica gli permettevano di coprire vasti settori della ricerca e di applicare nella pratica del laboratorio metodi innovativi, con l'obiettivo di ottenere risparmi di spesa, standardizzazione e automazione. Alcuni tecnici della vecchia generazione si lamentavano perché il lunedì mattina trovavano il "bicanale Technicon" con i segni della sperimentazione di nuovi tensioattivi, modifiche della metodica e dei flussi che Ceriotti assieme a qualche seguace aveva sperimentato nel fine settimana. Giovanni Ceriotti aveva maturato la sua esperienza nella ricerca in Carlo Erba, società per anni scuola di ricercatori che sono poi migrati in varie Ditte e Università, per poi prestare la sua opera negli Stati Uniti allo Sloan Kettering Institute, prestigiosa istituzione e centro di eccellenza in oncologia e al Centro Studio Tumori aggregato all'Ospedale di Busto Arsizio dove "allevò" un altro grande della SIBioC e della biochimica clinica italiana, Luigi Spandrio. Era un vero uomo del laboratorio di ricerca, una figura ormai scomparsa nel panorama attuale della medicina di laboratorio ed era certamente più apprezzato e riconosciuto a livello internazionale che locale, anche perché era persona riservata che non concedeva spazio a rapporti con la politica né aveva atteggiamenti di patteggiamento con le amministrazioni. Ho, ancora oggi, sopra il mio tavolo lo scritto di una relazione tenuta dal Professor Ceriotti sull'errore di laboratorio nella quale emerge con chiarezza quello che ho poi sviluppato nella mia vita professionale, la problematica della fase pre-analitica e di quella post-analitica che, a quei tempi, non godeva ancora del supporto dell'informatica.

Ma vorrei soprattutto ricordarlo per la sua grande umanità, per la bontà che traspariva in ogni incontro, per

¹Relativamente al metodo per il DNA, esiste anche uno scritto per Citation Classic del 1985, disponibile come materiale supplementare.

l'assenza di rancore o invidia verso altri Colleghi e protagonisti del laboratorio clinico. Non ho mai sentito uscire dalla sua bocca una brutta espressione, né una critica, se non costruttiva, verso i suoi collaboratori ma anche verso avversari nella scena scientifico-professionale. Quando andai a discutere con lui, che era costretto a letto per una lombosciatalgia, i motivi per i quali avevo deciso di trasferirmi a Verona, alla Scuola di Angelo Burlina, fu anche esageratamente comprensivo, conscio delle motivazioni che gli avevo riferito e rispettoso della mia decisione. E, in seguito, mi ha sempre seguito con stima e manifestato la sua soddisfazione quando rientrai a Padova e quando, dopo la scomparsa precoce di Angelo Burlina, divenni il Primario del Laboratorio che aveva diretto. Se ripenso a questi rapporti, alla modalità con la quale si relazionavano fra loro i Primari del tempo, e in particolare Angelo Burlina e Giovanni Ceriotti, espressioni diverse e complementari dell'evoluzione del laboratorio clinico, non posso che rimpiangere i tempi passati e invitare i giovani a guardare ai veri Maestri per migliorare la situazione attuale della medicina di laboratorio italiana. Durante tutti questi anni, il Professor Ceriotti mi ha rimproverato un'unica cosa e lo ha fatto anche in occasione della cerimonia di inaugurazione della nuova struttura del Laboratorio di Padova: non aver portato a termine uno dei suoi sogni, il Museo della Medicina di Laboratorio. Come i Colleghi più anziani fanno, Giovanni Ceriotti con la collaborazione di SIBioC e di molti Primari italiani, aveva raccolto una serie di strumentazioni che dovevano narrare la nascita e l'evoluzione del laboratorio clinico e aveva trovato il luogo dove organizzare questo Museo. Purtroppo, l'Azienda della Diagnostica che aveva ospitato le strumentazioni e aveva dato disponibilità a istituire il Museo, per problemi finanziari e mutamenti della situazione economica del Paese, decise successivamente di rivedere il progetto. Furono fatti altri tentativi, alcuni li feci nella mia qualità di Presidente della Società nell'ormai lontano 2004, quando il Sindaco di Brescia – saggiamente ispirato dal Professor Spandrio – aprì uno spiraglio di speranza, ma furono tutti sforzi vani. Ancor oggi, spero che nel Museo della Medicina di Padova (il MU_sMe) si possa inaugurare una sala dedicata alla medicina di laboratorio che ospiti alcuni strumenti che, assieme a Ceriotti, siamo riusciti ad accantonare in un magazzino dell'Azienda Ospedale-Università. Penso che anche questo suo sogno serva a capire chi fosse Giovanni Ceriotti, un uomo che voleva lasciare non solo il segno della sua opera, ma soprattutto quello dell'importanza del laboratorio clinico. Negli anni successivi al suo pensionamento, puntualmente nella settimana delle festività natalizie veniva nel Laboratorio Clinico che aveva diretto per salutare vecchi collaboratori e i nuovi professionisti e sempre era accolto con grande calore. Profondamente cattolico, ha fatto della professione un modo per interpretare la missione di migliorare la qualità del sistema sanitario e il mondo del laboratorio clinico. Chi ha avuto il privilegio di lavorare assieme a Lui non può che rendergli un affettuoso ringraziamento e seguire i suoi insegnamenti scientifici e di vita.

Mi auguro, e sicuramente mi impegnerò personalmente affinché la Società Scientifica della quale è stato uno dei fondatori, uno dei Presidenti, e uno dei Maestri, trovi le modalità per ricordarlo in modo appropriato e invito tutti a rileggere quello che ha scritto nel 1972 nella relazione di apertura del Congresso SIBioC a Padova², sintesi straordinariamente lucida delle finalità pratiche e dell'approfondimento delle conoscenze scientifiche che erano e rimangono i fondamenti della missione del laboratorio clinico.

Mario Plebani



Il prof. Giovanni Ceriotti nel giorno della laurea di Mario Plebani (Padova 1975).

²Nota della Redazione. Il contributo del Prof Giovanni Ceriotti è stato pubblicato su *Biochim Clin* 2012;36:36-9 con il titolo "Funzione e compiti del laboratorio nell'ospedale moderno" accompagnato da un commento del Prof. Ferruccio Ceriotti (*Biochim Clin* 2012;36:29-32).

Breve curriculum del Prof. Giovanni Ceriotti

Il Prof. Giovanni Ceriotti è stato uno dei soci fondatori di SIBioC nel 1969 assieme ai Prof. Vanzetti, Marini Bettolo, Zambotti, Franzini e Rossi; è stato nel Direttivo della Società dal 1969 al 1975 e dal 1977 al 1987, IFCC National Representative dal 1978 al 1985, ne è stato Presidente dal 1978 al 1980.

Ha fondato e diretto per 20 anni, dal 1975 al 1994 il “*Giornale Italiano di Chimica Clinica*”. È stato nell’Editorial Board di *Clinica Chimica Acta* dal 1979 al 1998.

Ha pubblicato oltre 180 lavori su riviste nazionali e internazionali (tra cui 3 lavori su *Nature*) e il suo lavoro sulla quantificazione del DNA pubblicato nel 1952 e quello sulla quantificazione dell’RNA del 1955 sono stati tra i lavori più citati in assoluto nel mondo fino agli anni '85.

Vince una borsa di studio presso il Collegio Ghislieri di Pavia nel 1936.

Laureato in Medicina all’Università di Pavia nel 1942, dopo un breve soggiorno in Austria (marzo – agosto 1943 Biochemistry Institute of Vienna University, Director Prof. Barrenscheen) dove inizia i suoi studi sulla quantificazione degli acidi nucleici, torna Italia a causa delle vicende belliche.

Nell’ottobre 1945 viene assunto nel dipartimento di ricerca della Carlo Erba dove lavora fino al settembre 1949 seguendo numerosi progetti su acidi nucleici, enzimi e soprattutto tecniche microbiologiche per produrre istamina e istidina e per misurare vari amminoacidi.

Dal settembre 1949 al settembre 1950 ottiene una borsa di studio presso il Memorial Sloan-Kettering Institute for Cancer Research di New York. In questo anno completa gli studi sulla misura del DNA e dell’RNA su estratti di tessuto.

Tornato in Italia diventa vice direttore del Dipartimento di ricerca biologica e farmacologica della Carlo Erba e, dal gennaio 1952, Direttore del Dipartimento di ricerca microbiologica. Tra i vari progetti portati avanti in quel periodo quello di maggior successo è la messa a punto di un nuovo farmaco per il trattamento della tubercolosi (acido isonicotinoil-idrazino-metansulfonico) più attivo e meno tossico di quelli in uso.

Nel maggio 1953 diventa Direttore del nuovo Centro Tumori di Busto Arsizio (VA) dove lavora per 14 anni dedicandosi prevalentemente alla ricerca e allo studio di metodi per individuare e isolare sostanze prodotte dai tumori. Inoltre isola e purifica numerose sostanze con attività antibiotica e un antimitotico molto attivo: la narciclasina.

Dal maggio 1961 dirige anche il Laboratorio analisi dell’Ospedale di Busto Arsizio.

Nel giugno 1967 il Prof. Ceriotti si sposta a Padova per dirigere il Laboratorio dell’Ospedale Civile dove rimane fino al 1983.

Dal 1983 al 1988 lavora come Professore Associato di Chimica Clinica presso la facoltà di Farmacia dell’Università di Padova, città dove poi ha sempre vissuto.

Ferruccio Ceriotti



BIO MEDIA
editore

news

Consulta il

Catalogo editoriale...

Cosa c'è

di nuovo in Libreria?

scopriilo su www.biomedica.net

seguici su





SIBioC-Medicina di Laboratorio è su Facebook!

Seguici cliccando "MI PIACE" nella pagina

www.facebook.com/SIBioCmedicinadilaboratorio

**per rimanere sempre aggiornato con news, attività formative,
progetti e tante altre iniziative sulla
Medicina di Laboratorio**

**TI ASPETTIAMO!
*SIBioC-Medicina di Laboratorio***



BIO MEDIA

LA CONDIVISIONE DEL SAPERE

Ricerca, diagnosi, cura, innovazione: i capisaldi della nostra salute, hanno in comune lo sviluppo della conoscenza e la diffusione del sapere.

Da oltre vent'anni, ogni giorno, mettiamo a disposizione le nostre risorse per consentire al complesso network dei professionisti della salute di conoscersi, aggiornarsi e confrontarsi, per il loro obiettivo comune: la salute di tutti noi.

 **BIO MEDIA**

Via L. Temolo 4 - 20126 Milano Tel. 02/45498282 - Fax 02/45498199 - www.biomedica.net