

---

---

# BC

---

---

## biochimica clinica

In questo numero:

**ESAMI DI LABORATORIO IN PRONTO SOCCORSO**

*vedi pag. 183*

**INTERVALLI DI RIFERIMENTO PEDIATRICI  
DELLA FOSFATASI ALCALINA**

*vedi pag. 166*



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



<b>EDITORIALE</b>	<b>119</b>	Ricordo di Carlo Franzini <i>M. Panteghini</i>
<b>RASSEGNE</b>	<b>120</b>	Aggiornamenti in tema di diagnostica della carenza di ferro <i>C. Camaschella, A. Pagani</i>
	<b>128</b>	Trombocitosi e rischio trombotico nelle neoplasie mieloproliferative <i>C. Giaccherini, M. Marchetti, A. Falanga</i>
	<b>134</b>	Il ruolo del laboratorio di citogenetica in oncematologia <i>U. Giussani, A. Pansa</i>
<b>CONTRIBUTI SCIENTIFICI</b>	<b>142</b>	Indagine conoscitiva su matrice biologica e gestione della fase preanalitica nei laboratori clinici <i>G. Lippi, D. Giavarina per il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio</i>
	<b>148</b>	Accuratezza dell'immunonefelometria come metodo di screening per la determinazione della proteinuria di Bence Jones <i>P. Natali, G. Patelli, S. Tagliavini, D. Carra, M.R. Cucinelli, M. Varani, T. Trenti</i>
	<b>154</b>	Analisi dei profili della troponina T cardiaca ottenuti con spettrometria di massa MALDI nel siero di soggetti sani e malati <i>B. Rampoldi, R. Rigolini, E. Costa, C. Fania</i>
	<b>161</b>	False negative results in urinary cocaine drug testing <i>M. Agostini, C. Renzoni, D. Melita</i>
	<b>166</b>	Intervalli di riferimento standardizzati della fosfatasi alcalina sierica in soggetti pediatrici <i>F. Ceriotti, M. Panteghini, E. Guerra, R. Leoncini, G. Cevenini</i>
<b>DOCUMENTI</b>	<b>175</b>	Le revisioni della letteratura biomedica <i>V. Pecoraro, G. Banfi, P. Pezzati, T. Trenti per il Gruppo di Studio SIBioC Medicina di Laboratorio Basata sull'Evidenza</i>
<b>DOCUMENTI SIBioC</b>	<b>183</b>	Esami di laboratorio in Pronto Soccorso: una proposta di consenso SIBioC-Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care <i>G. Lippi, M. Panteghini, S. Bernardini, L. Bonfanti, P. Carraro, I. Casagrande, M. Cavazza, F. Ceriotti, M. Ciaccio, D. Coen, D. Giavarina, F. Giostra, C. Paolillo, M. Plebani, G. Ricci, G. Cervellin</i>
<b>LETTERE ALL'EDITORE</b>	<b>189</b>	Validazione per l'impiego clinico delle determinazioni di emoglobina ed ematocrito sull'emogasanalizzatore GEM Premier 4000 <i>E. Aloisio, A. Panzeri, S. Birindelli, A. Dolci, M. Panteghini</i>
<b>NOTIZIE SIBioC</b>	<b>192</b>	In ricordo di un grande Amico e Maestro <i>P. Bonini</i>
	<b>194</b>	In ricordo di Silvana Penco <i>A. Mosca</i>
<b>CASI CLINICI</b>	<b>e9</b>	Conteggio e contenuto di emoglobina reticolocitaria in un caso di grave anemia <i>B. Manenti, M. Seghezzi, P. Dominoni, L. Cerutti, A. Crippa, S. Buoro</i>
	<b>e13</b>	Utilità della spettroscopia all'infrarosso per l'analisi dei calcoli urinari <i>A. Primiano, P.M. Ferraro, S. Persichilli, G. Gambaro, A. Schiattarella, C. Zuppi, J. Gervasoni</i>

# biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti

## 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

Mauro Panteghini

### Reviews Editor

Maria Stella Graziani

### Associate Editors

Marco Besozzi  
Ferruccio Ceriotti  
Alberto Dolci  
Davide Giavarina  
Giampaolo Merlini  
Andrea Mosca  
Rossella Tomaiuolo

### Editorial Secretary

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

### Responsible Editor

Giuseppe Agosta

### Publisher

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

### SIBioC Executive Board

2016-2017

Sergio Bernardini  
Sabrina Buoro  
Assunta Carnevale  
Ferruccio Ceriotti (Past President)  
Marcello Ciaccio (Presidente)  
Davide Farci Santarcangeli  
Silvia Mengozzi  
Michele Mussap  
Antonello Nonnato  
Massimo Quercioli  
Tommaso Trenti  
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 41

### Numero 2 - Giugno 2017

## Ricordo di Carlo Franzini

Mauro Panteghini

Anche se mi costa molto sforzo scrivere di Carlo Franzini dopo che ci ha lasciato, sento che lo devo fare per rispetto alla Sua figura di Uomo e di Professionista.

Ho avuto la possibilità di condividere con Lui molti momenti, non solo professionali, a partire da quando io, giovane allievo della Scuola di Specialità di Pavia, lo conobbi per la prima volta come Docente della nostra materia. Passati decenni, ancora indelebile è il momento nel quale Carlo (mi "ingiunse" quasi subito di dargli del tu e chiamarlo per nome) scrisse alla lavagna (sì con il gesso bianco) l'elenco delle riviste internazionali la cui lettura riteneva irrinunciabile: più o meno quello stesso elenco di riviste che ancora oggi mensilmente consulto per cercare di rimanere aggiornato in campo scientifico.

Se mi si chiedesse con quale parola ricordarlo credo che sceglierei "Cultura". Difficilmente ho incontrato nella vita persone di altrettanto elevato livello scientifico, dalle quali imparare concetti, a volte anche complessi, o discutere di argomenti, nei quali Carlo si è poi mostrato antesignano. Mi piace ricordare lo studio della variabilità biologica (e la sua giusta insistenza a sottolineare gli errori statistici compiuti dai più nell'ignoranza della distribuzione statistica dei dati) e il perfezionamento del concetto di "commutabilità" (in tempi nei quali a livello internazionale andava ancora per la maggiore proporre l'uso di materiali purificati per armonizzare la calibrazione dei sistemi analitici di misura).

In questo momento guardo in un cassetto della mia scrivania il libretto rosso sulle "Unità SI nel laboratorio clinico" da Lui prodotto nel 1980, il cui contenuto sarà poi pubblicato in estenso sul *Giornale Italiano di Chimica Clinica* nel 1988, articolo che continua a essere la fonte primaria delle mie decisioni in merito a come uniformare la refertazione degli esami dei laboratori da me oggi diretti.

Dirigo questa rivista scientifica, occupo una cattedra universitaria e sono responsabile di un laboratorio e un dipartimento di medicina di laboratorio, che vedevano Lui, prima di me, occupare le stesse cariche e posizioni. Mi piace ricordarlo in due momenti, immortalati nelle immagini associate a questo testo, che lo ritraggono una decina di anni fa insieme agli altri Editori Associati di *Biochimica Clinica*, nel momento del passaggio della direzione della rivista al sottoscritto e poi, esattamente 4 anni or sono, quando, in occasione del Congresso EuroMedLab che si svolse a Milano, ebbi l'onore di consegnargli il premio assegnatogli dalla nostra Società la cui motivazione recitava "per il Suo rigore scientifico e la dedizione allo sviluppo e alla promozione della *Biochimica Clinica*, che hanno reso SIBioC un punto di riferimento in Italia e nel mondo intero."



## Aggiornamenti in tema di diagnostica della carenza di ferro

Clara Camaschella, Alessia Pagani

Università Vita Salute e IRCCS San Raffaele, Milano

### ABSTRACT

**Update on diagnostics of iron deficiency.** Iron deficiency and iron deficiency anemia are common worldwide, affecting prevalently young people and women because of the high iron demand during growth and fertile age. The main causes of iron deficiency in developing countries are inappropriate dietary iron intake and blood loss due to intestinal worm colonization, while, in western countries, common causes as unbalanced diet and pathologic conditions, such as malabsorption and chronic blood loss prevail. Erythropoietin administration, stimulating erythropoiesis, may cause functional iron deficiency in the erythroid compartment, despite adequate iron stores. Iron deficient anemia, in general easy to diagnose, should be also cause-diagnosed for adequate therapy. The diagnosis of iron deficiency in chronic inflammatory conditions is more difficult. The soluble transferrin receptor/ferritin logarithm ratio and serum hepcidin concentrations have been proposed as potential markers of iron deficiency in inflammation. Oral iron salt administration improves iron deficiency in many cases, since hepcidin reduction allows efficient iron absorption, but side effects of oral treatment reduce its efficacy and may require parenteral iron administration.

### INTRODUZIONE

Una condizione di sideropenia è molto frequente. Si stima che gli individui sideropenici (con associata o meno anemia) siano più di due miliardi, rappresentando oltre un quarto della popolazione mondiale. L'anemia sideropenica è la forma di anemia più diffusa; la prevalenza maggiore è nei paesi in via di sviluppo, ma il problema è rilevante anche nei paesi occidentali, dove spesso non è tenuto in debita considerazione (1). Le conseguenze della carenza di ferro sono importanti soprattutto nei bambini e nelle donne in gravidanza, gruppi particolarmente a rischio di sideropenia in relazione all'aumentato fabbisogno di ferro. Molti studi osservazionali sottolineano come l'anemia sideropenica impatti negativamente sullo sviluppo cognitivo nella prima infanzia, sulla morbilità e mortalità nelle donne gravide e anche sulle prestazioni lavorative nelle attività manuali. Un problema importante e ampiamente dibattuto è l'effetto della carenza di ferro a livello di organi e tessuti (ad es., muscoli, cuore e cervello), specie quando si manifesta in assenza di anemia, anche in funzione dei potenziali benefici conseguenti al trattamento della sideropenia. L'argomento è complesso, soprattutto perchè non sono disponibili metodi per quantificare la carenza di ferro tissutale; per questa

ragione, molte conclusioni sugli effetti dannosi della sideropenia si basano sul miglioramento dopo trattamento con ferro (criterio *ex iuvantibus*).

L'omeostasi del ferro è strettamente regolata a livello cellulare e sistemico. A livello cellulare il ferro regola i propri trasportatori tramite le proteine regolatorie IRP1 e IRP2. L'epcidina, un peptide attivo di 25 amminoacidi che è sintetizzato da un precursore inattivo a livello epatico, controlla la regolazione sistemica del ferro con un meccanismo squisitamente omeostatico (2). L'epcidina si lega al suo recettore ferroportina degradandolo e inibendo in tal modo il rilascio di ferro in circolo. La ferroportina è ubiquitaria, ma è particolarmente espressa sulla membrana basolaterale degli enterociti duodenali, sulla membrana dei macrofagi splenici, che riciclano il ferro dei globuli rossi, sugli epatociti e sulla superficie delle cellule del trofoblasto. L'espressione di epcidina aumenta in risposta all'incremento del ferro circolante e tissutale e si riduce nel corso di sideropenia con effetti opposti sul ferro circolante. La necessità di ferro per la sintesi di emoglobina (Hb) nel compartimento eritropoietico rende ragione delle richieste di ferro da parte del midollo osseo e dell'esistenza in questa sede di regolatori eritroidi per l'epcidina (2). Tuttavia la capacità di assorbire ferro a livello intestinale è limitata e, per questa ragione, gli individui a rischio per sideropenia

Corrispondenza a: Clara Camaschella, Università Vita Salute e IRCCS San Raffaele. Via Olgettina 58, 20132 Milano. Tel. 0498217919-0498212170, E-mail camaschella.clara@hsr.it

Ricevuto: 18.07.2016

Revisionato: 04.10.2016

Accettato: 09.11.2016

Publicato on-line: 08.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.019

sono i bambini, per l'espansione rapida della massa eritropoietica, le donne giovani, per compensare le perdite mestruali, e le donne in gravidanza per sostenere l'eritropoiesi fetale (3). Anche i donatori di sangue possono sviluppare carenza di ferro dopo ripetute donazioni (4).

Nei paesi in via di sviluppo, la dieta insufficiente o ricca di sostanze (fitati, tannini) che riducono la disponibilità di ferro e le infestazioni da parassiti sono le cause principali di sideropenia (1). Nei paesi occidentali, l'anemia sideropenica in genere deriva da una condizione patologica associata a perdite croniche di sangue o a malassorbimento, se si eccettuano i gruppi menzionati sopra considerati a rischio per aumento delle richieste di ferro (3).

La diagnosi di sideropenia e di anemia sideropenica è ben codificata, ma può divenire complessa nei casi in cui si associa a patologie infiammatorie croniche. Infatti, l'incremento di citochine infiammatorie e quindi di epcidina causa una maldistribuzione del ferro che si accumula nei macrofagi; l'incremento della concentrazione di ferritina sierica conseguente all'infiammazione rende ancora più complicata la diagnosi.

Questa rassegna è dedicata alla messa a fuoco degli approcci diagnostici per l'anemia sideropenica, alla luce delle nuove conoscenze sulla regolazione dell'omeostasi del ferro.

### MECCANISMI DI ADATTAMENTO ALLA CARENZA DI FERRO

Lo sviluppo di sideropenia e ancor più di anemia sideropenica procede per gradi. Nel primo stadio, definito della "sideropenia senza anemia", si riducono i depositi di ferro. Nello stadio successivo, il ferro circolante non riesce a sopperire alle necessità dell'eritropoiesi e si manifesta "un'eritropoiesi ferro-carente". Se il processo non si arresta, si arriva alla "anemia sideropenica" vera e propria che può essere anche di notevole entità, ma è in genere ben tollerata, soprattutto se si instaura molto lentamente e se il compenso cardiovascolare è efficiente (3). Si può ipotizzare che una simile gradualità sia comune a tutti gli organi, anche se non esistono evidenze definitive al riguardo.

La riduzione della sintesi di epcidina a livello epatico è uno dei primi meccanismi messi in atto nel tentativo di aumentare il rilascio di ferro in circolo, mediante aumento dell'attività della ferroportina, sia negli enterociti duodenali, che assorbono ferro, che nei macrofagi, che rilasciano in circolo il ferro recuperato dall'eritrocateresi (Figura 1) (3).

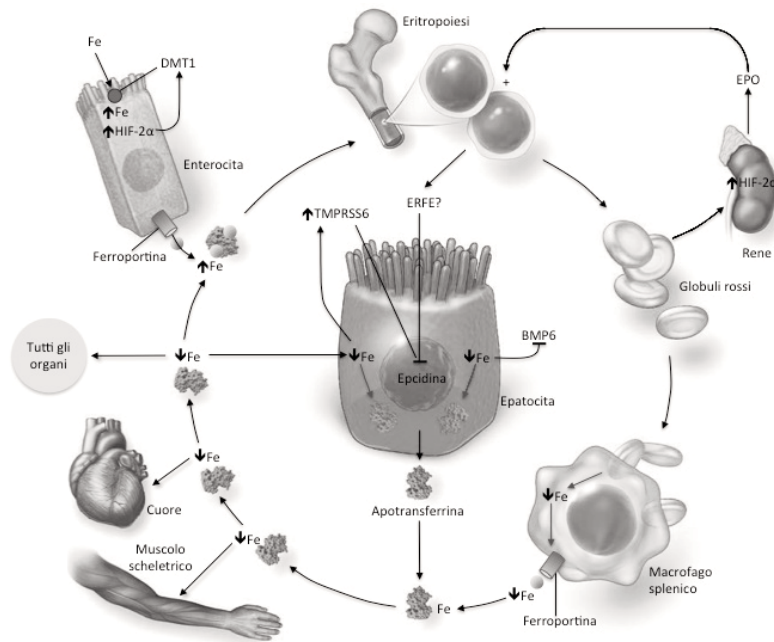
La proteasi transmembrana codificata dal gene *TMPRSS6* si attiva in corso di carenza di ferro per reprimere la via di segnale BMP-SMAD e quindi la sintesi di epcidina (5). Questi meccanismi cooperano per mantenere la concentrazione di ferro e un'eritropoiesi efficace, evitando allo stesso tempo un'eccessiva restrizione del ferro destinato alle altre cellule. La

degradazione della ferritina avviene mediante ferritinofagia, un processo autofagico mediato dalla proteina cargo coattivatore del recettore nucleare 4 (NCOA4), che indirizza la ferritina ai lisosomi per la degradazione (6). È probabile che questo meccanismo sia importante per riciclare il ferro in condizioni di sideropenia, ma non è ancora dimostrato. Nel topo "knock out" per NCOA4 la sideropenia protratta induce un maggior grado di anemia in quanto la ferritina, meno degradata, non rilascia ferro a sufficienza (7). Quando l'anemia sideropenica diviene conclamata, il fattore inducibile dall'ipossia  $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) aumenta la produzione di eritropoietina nel rene. HIF-2 $\alpha$  aumenta anche l'espressione della proteina duodenale trasportatore dei metalli bivalenti 1 (DMT1), che importa il ferro del lume nella mucosa duodenale, della reduttasi citocromo B duodenale (DCYT-B), che coopera con DMT1, e della ferroportina duodenale, creando le condizioni per un assorbimento ottimale del ferro (8).

### CAUSE NOTE ED EMERGENTI DI SIDEROPENIA

Le condizioni a rischio per carenza di ferro sono elencate nella Tabella 1 (9). Le principali cause di sideropenia, in un soggetto che non ha restrizioni dietetiche, sono la riduzione dell'assorbimento di ferro e la perdita cronica di sangue. La prima condizione può realizzarsi in seguito a interventi chirurgici a carico dello stomaco, con conseguente riduzione dell'acidità gastrica, e/o del duodeno, sede principale dell'assorbimento del ferro (10). La sideropenia è spesso presente nei pazienti obesi, soprattutto di sesso femminile. La chirurgia bariatrica eseguita per controllare l'apporto calorico e l'iperglicemia nei soggetti diabetici con obesità di grado elevato stanno emergendo come cause potenziali di sideropenia, soprattutto negli Stati Uniti (11). Condizioni rare, come la gastrite atrofica autoimmune, frequenti, come l'infezione da *Helicobacter pylori*, o spesso non diagnosticate, come il morbo celiaco dell'adulto, riducono l'assorbimento intestinale di ferro; tali condizioni sono resistenti al trattamento con ferro per via orale (10, 12).

La sideropenia nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) spesso riconosce cause multiple come il ridotto assorbimento di ferro e la perdita di sangue, oltre alla sideropenia secondaria agli alti livelli di epcidina, che sono tipicamente presenti in questa come in altre condizioni infiammatorie croniche. Nell'ambito di queste ultime condizioni la combinazione anemia sideropenica e anemia da infiammazione è tutt'altro che infrequente ed è di difficile diagnosi (13). Ne è esempio l'anemia del paziente con insufficienza renale cronica in cui possono essere presenti simultaneamente perdite di sangue, soprattutto nei dializzati, infiammazione cronica ed elevati livelli di epcidina. L'iperepcidinemia, conseguente ad aumentata produzione e ridotta escrezione del peptide, associata al trattamento con agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA) (14), può indurre uno squilibrio tra le



**Figura 1**

*Il ciclo del ferro: meccanismi di adattamento alla ridotta disponibilità di ferro.*

L'adeguamento alla ridotta disponibilità di ferro è basato sulla riduzione dei livelli dell'ormone epatico epidina e sull'ipossia tissutale che si sviluppa come conseguenza dell'anemia. L'aumentata produzione di eritropoietina (EPO) da parte del rene in risposta all'incremento del fattore inducibile dall'ipossia 2α (HIF-2α) determina un aumento dell'eritropoiesi con produzione di globuli rossi microcitici e ipocromici in funzione della ridotta disponibilità di ferro. Gli eritrociti senescenti vengono degradati dai macrofagi e il ferro viene riciclato in circolo. La maggiore eritropoiesi inibisce la produzione di epidina. Nel topo questa funzione è svolta dall'eritroferone (ERFE), che viene secreto dagli eritroblasti per mantenere un adeguato apporto di ferro e un'eritropoiesi efficiente. HIF-2α aumenta l'espressione del trasportatore dei metalli bivalenti 1 (DMT1) sulla membrana apicale degli enterociti per consentire un maggiore assorbimento del ferro assunto con la dieta. I livelli di epidina vengono ridotti in risposta a diversi stimoli: una diminuzione dei segnali attivatori (transferrina diferrica, contenuto di ferro nel fegato, proteina morfogenetica dell'osso 6), una maggiore attività del suo inibitore matriptasi-2 (TMPRSS6) e un'aumentata eritropoiesi come conseguenza dello stimolo eritropoietinico. La ferroportina, non più degradata a causa delle ridotte concentrazioni di epidina, esporta in circolo il ferro disponibile dagli enterociti, attraverso la membrana basolaterale, e dai depositi nei macrofagi. Una volta esauriti i depositi, la concentrazione di ferro circolante si riduce anche se l'assorbimento intestinale aumenta. La ridotta quantità di ferro nel fegato determina un aumento dell'apotransferrina (transferrina senza ferro legato) rispetto alla transferrina carica di ferro. Di conseguenza, l'ingresso di ferro in cellule e organi (ad es., muscolo scheletrico e cuore) tramite il recettore della transferrina risulta diminuito.

**Tabella 1**

*Eziologia della sideropenia*

Cause fisiologiche	Aumentate richieste: infanzia, adolescenza, II e III trimestre di gravidanza
Dieta inadeguata	Malnutrizione, vegetariani, vegani, cibi poveri di ferro
Diminuito assorbimento intestinale	Gastrectomia, "bypass" duodenale, chirurgia bariatrica, infezione da <i>H. pylori</i> , morbo celiaco, gastrite atrofica, malattie infiammatorie intestinali, farmaci (inibitori di pompa, antagonisti dei recettori H <sub>2</sub> ) Anemia sideropenica refrattaria al ferro (IRIDA)
Perdite croniche di sangue	Tratto gastrointestinale: qualsiasi lesione benigna o maligna, <i>anchilostoma duodenalis</i> , farmaci (salicilati, corticosteroidi, farmaci antinfiammatori non steroidei) Apparato genitourinario: sanguinamento uterino, emolisi intravascolare (ad es., emoglobinuria parossistica notturna) Difetti emorragici (ad es., telangiectasia ereditaria emorragica) Donatori di sangue
Associata ad altre cause	Insufficienza renale cronica, malattie infiammatorie croniche intestinali, scompenso cardiaco, obesità

aumentate richieste di ferro e la sua insufficiente mobilizzazione dalle sedi di accumulo fisiologico, causando un deficit di ferro funzionale. Sono in aumento le segnalazioni di carenza di ferro nei pazienti con scompenso cardiaco congestizio (15, 16), nei pazienti

neoplastici e negli anziani, spesso in associazione a stati infiammatori, concentrazioni ridotte di eritropoietina e comorbidità multiple (9). Negli obesi, l'infiammazione cronica anche subclinica, la produzione di epidina da parte del tessuto adiposo e le alterazioni nella

produzione di adipochine possono portare a ridotto assorbimento di ferro, sideropenia e anemia sideropenica (9).

### SIDEROPENIA E GENETICA

Forme genetiche di anemia da carenza di ferro sono estremamente rare. L'anemia sideropenica refrattaria al ferro (IRIDA) è una condizione recessiva causata da mutazioni del gene *TMPRSS6*, che codifica la proteasi transmembrana matriptasi-2. Quest'ultima inibisce la trascrizione di epcidina, rimuovendo dalla superficie cellulare il corecettore della via BMP-SMAD-emogiuvina (17). Alti livelli di epcidina in pazienti con IRIDA limitano il rilascio di ferro in circolo dalle sedi di assorbimento e di deposito e causano anemia microcitica ipocromica tipicamente non responsiva al ferro orale (18). Questo disordine è solitamente rilevato in bambini o pazienti giovani con anemia persistente e refrattaria al ferro orale, in assenza di condizioni gastrointestinali che ne limitino l'assorbimento intestinale (10). IRIDA ha anche suscitato interesse sul problema della suscettibilità genetica alla sideropenia. Diversi studi di associazione "genome wide" (GWAS) e una recente meta-analisi, indicano che varianti genetiche da polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) di *TMPRSS6* si associano a variazioni dei parametri ematologici del globulo rosso come Hb, ematocrito (Hct), volume corpuscolare medio (MCV) e contenuto medio di emoglobina (MCH), in caucasici e asiatici (19, 20). La variante più comunemente associata è la rs855791, che induce un cambiamento amminoacidico da alanina a valina in posizione 736 (A736V) nella proteina codificata da *TMPRSS6* e influenza la concentrazione sierica di epcidina e, di conseguenza, altri esami di laboratorio relativi al metabolismo del ferro (21).

La suscettibilità genetica alla carenza di ferro è più facile da dimostrare nei donatori di sangue che nella popolazione generale. Donatrici donne, portatrici dell'allele 736A della variante rs855791 associata a basse concentrazioni di epcidina, sembrano più resistenti allo sviluppo di carenza di ferro dopo la donazione in confronto a donatrici con altre varianti associate ad alte concentrazioni di epcidina (22).

Uno studio svedese ha valutato l'effetto di 6 SNP in geni del ferro come *HFE*, *Transferrina*, *TMPRSS6* sui livelli di ferritina in più di 14.000 donatori di sangue: in *HFE*, l'allele G della SNP rs1800562 era associato in entrambi i sessi con depositi di ferro più bassi, l'allele C della rs179945 nello stesso gene si associava con depositi di ferro più bassi solo nel sesso maschile e l'omozigosi per lo stesso allele si associava a carenza di ferro nelle donne. *TMPRSS6* 736V era associato negativamente ai depositi di ferro nei maschi (23).

Sulla stessa linea, donatori maschi portatori di un polimorfismo (P582S) in *HIF-1 $\alpha$* , che stabilizza la proteina e quindi facilita la risposta all'ipossia, hanno più elevate concentrazioni ematiche di Hb e ferritina e sono protetti dalla carenza di ferro a seguito delle donazioni,

se paragonati a donatori omozigoti per l'allele normale (22). Questi studi preliminari suggeriscono la possibilità di migliorare la salute dei donatori nell'ottica di una personalizzazione della donazione.

### DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLA SIDEROPENIA

#### Parametri del ferro

La ferritina sierica, a una concentrazione <30  $\mu\text{g/L}$ , è il parametro più sensibile e specifico per identificare una sideropenia, condizione caratterizzata da riduzione dei depositi di ferro in assenza di anemia (Tabella 2) (24). Nella progressione della carenza, si riduce il ferro circolante e aumenta la sintesi di transferrina, per cui l'indice di saturazione percentuale della transferrina (TS%) nella carenza di ferro conclamata scende al di sotto del 16%. La riduzione di transferrina diferrica, il ligando fisiologico del recettore della transferrina, limita la cessione di ferro al midollo eritroide e ad altri tessuti. La ferritina sierica è generalmente <12  $\mu\text{g/L}$  quando si instaura anemia, ma sono comuni variazioni individuali (3). Con l'incremento della carenza di ferro viene in parallelo rilasciato in circolo il recettore solubile della transferrina (sTfR) per azione di una proteasi, che taglia il recettore di membrana negli eritroblasti quando questo non è legato al suo ligando naturale, la transferrina diferrica, che, come detto, in corso di sideropenia si riduce (25).

Nell'anemia sideropenica sia TS% che ferritina sierica sono consensualmente ridotte. TS% può anche essere ridotta (<20%) nell'anemia da malattia cronica (ACD), nella quale, invece, la concentrazione sierica di ferritina è aumentata, riflettendo il sequestro di ferro macrofagico. In presenza di infiammazione, invece, TS% e sTfR non aumentano (13). Una metanalisi dei lavori relativi all'utilizzo diagnostico di sTfR ha evidenziato un suo potenziale ruolo diagnostico (26). Mentre la distinzione tra anemia sideropenica e ACD è abbastanza semplice e lineare, la diagnosi di anemia sideropenica in corso di malattie infiammatorie croniche è più complessa (Tabella 2). In queste condizioni la carenza di ferro viene diagnosticata in pratica con un cut-off per la ferritinemia arbitrariamente posto a <100  $\mu\text{g/L}$  (13), ma in alcune condizioni, quali scompenso cardiaco cronico o insufficienza renale cronica, si accettano anche concentrazioni sieriche di ferritina più elevate purchè in presenza di TS% <20%. L'utilità dell'impiego del dosaggio del sTfR in queste condizioni rimane da confermare (27). La colorazione di Perls su striscio di midollo osseo potrebbe essere dirimente, visualizzando l'assenza di ferro nei macrofagi e negli eritroblasti nella sideropenia e la presenza di ferro nei macrofagi, ma non negli eritroblasti, nell'ACD. Tuttavia, mentre un tempo la colorazione di Perls su striscio di aspirato midollare era considerata il "gold standard" per la diagnosi di sideropenia, attualmente è caduta in disuso, in quanto non quantitativa e perché richiede una procedura invasiva per la raccolta del campione

biologico (3). Di conseguenza, la diagnosi di sideropenia in corso di ACD non deve mai basarsi su un singolo esame, ma richiede la valutazione globale delle condizioni del paziente e un approccio multiparametrico (Tabella 2).

Nell'IRIDA si osserva una discrepanza tra i valori di TS%, che sono molto ridotti, e la concentrazione sierica di ferritina, che può essere a livelli fisiologici o appena inferiore, differenziando in questo modo IRIDA dalle altre anemie microcistiche (28). La concentrazione di proteina C-reattiva (PCR) permette di differenziarla dall'ACD. Dosare l'epcidina sierica può essere utile in IRIDA, perché i livelli sono abnormemente elevati (o anche normali, ma inappropriati alla condizione di sideropenia presente) (29). Il dosaggio di epcidina può essere effettuato mediante spettrometria di massa, accurata ma ancora poco diffusa nei laboratori clinici, o mediante ELISA, che permettono di dosare il peptide attivo di 25 amminoacidi. Tali saggi, principalmente usati per ricerca, sono ancora scarsamente disponibili per uso diagnostico. L'ostacolo maggiore all'utilizzo clinico è rappresentato dalla scarsa armonizzazione tra i diversi metodi e saggi disponibili (30). Uno studio recente sull'armonizzazione della determinazione dell'epcidina ha dimostrato che utilizzando un materiale di riferimento secondario commutabile è possibile migliorare la correlazione tra i diversi saggi tanto che, con una

simulazione matematica di calibrazione armonizzata, si è ottenuta una variabilità <8% della concentrazione di epcidina misurata con gli 11 saggi valutati (31). Questo studio e soprattutto la disponibilità di un materiale di riferimento secondario commutabile aprono la strada verso l'implementazione, in un futuro auspicabilmente prossimo, di un sistema internazionale di riferimento per la standardizzazione della determinazione dell'epcidina che, quando sarà disponibile, permetterà di utilizzare a scopo diagnostico i risultati di epcidina indipendentemente dal metodo o saggio con il quale è stato eseguito, purché sia riferibile al metodo gerarchicamente superiore (31). Le possibili indicazioni al dosaggio dell'epcidina sierica relative a patologie da carenza o sovraccarico di ferro sono riassunte nella Tabella 3. Per la corretta valutazione dei risultati di epcidina è molto importante che siano utilizzati limiti di riferimento stratificati per sesso e per età. Funzionalità epatica e renale possono influenzare la concentrazione sierica di epcidina.

### Indici eritrocitari

MCV e MCH sono tipicamente ridotti nell'anemia sideropenica. L'ampiezza della curva di distribuzione dei globuli rossi (RDW), una misura della variazione del volume eritrocitario, è aumentata, specialmente nelle

**Tabella 2**

*Esami di laboratorio utilizzati per la valutazione dello stato marziale e loro modificazioni nelle patologie da carenza di ferro*

Esame	Sideropenia	Sideropenia funzionale	Anemia sideropenica	IRIDA	ACD	Sideropenia + ACD	Intervallo di riferimento (adulti)
Sideremia, µg/dL	↓	N/↓	↓	↓	↓	↓	56-168
Saturazione transferrina, %	≥16	N/↓	<16	<10	N/↓	N/↓	17-44
Ferritinemia, µg/L	<30	N	<12	Variabile	>100	<100	20-200 (F) 40-300 (M)
Emoglobina, g/L	N	N	↓	↓	↓	↓	>120 (F) >130 (M)
MCV, fL	N	N	<80	↓↓	N/↓	↓	80-95
MCH, pg	N	N	<27	↓↓	N/↓	↓	27-34
<i>Esami di impiego meno frequente</i>							
sTFR, mg/L	↑	↑	↑	↑	N/↓	Variabile	<sup>a</sup>
sTFR/log ferritina	ND	ND	>2	>2	<1	>2	<sup>a</sup>
ZPP	N	↑	↑	↑	↑	↑	<sup>a</sup>
Epcidina sierica	↓	↓	↓↓	N/↓	↑	N/↑	<sup>a</sup>
CHr, pg	↓	↓	↓	↓	↓	↓	<sup>a</sup>
Colorazione di Perls (midollo osseo)	+	+/-	-	+	+++	+	+

*IRIDA, anemia sideropenica refrattaria al ferro; ACD, anemia da malattia cronica; N, normale; F, femmine; M, maschi; MCV, volume globulare medio; MCH, contenuto medio di emoglobina; sTFR, recettore solubile della transferrina; ND, non disponibile; ZPP, zincoprotoporfirina; CHr, contenuto medio di emoglobina reticolocitaria.*

<sup>a</sup>Gli intervalli di riferimento sono metodo dipendenti.

**Tabella 3***Possibili applicazioni cliniche del dosaggio dell'epcidina sierica*

Applicazione	Commento
Sospetto di anemia sideropenica refrattaria al ferro (IRIDA)	L'esame è diagnostico in un contesto clinico appropriato
Sovraccarico genetico di ferro	Utile nell'emocromatosi giovanile e nella malattia da ferroportina tipo B
Diagnosi di anemia sideropenica in concomitanza ad anemia da malattia cronica	In associazione ad altri esami (ad es., recettore solubile della transferrina)
Indicazione per la terapia marziale	Per selezionare i casi che richiedono terapia con ferro per via endovenosa; in bambini sideropenici in aree endemiche per malaria nei paesi in via di sviluppo

fasi iniziali della sideropenia, quando i globuli rossi di nuova produzione coesistono in circolo con i più vecchi, prodotti prima dell'instaurarsi della carenza di ferro. La RDW è aumentata anche a seguito di terapia marziale, che migliora l'emoglobinizzazione degli eritrociti, distinguendo quelli di nuova produzione da quelli ipocromico-microcitici. RDW e indici eritrocitari non variano in genere in corso di ACD. La diagnosi differenziale di anemia microcitica in generale, soprattutto con le forme ereditarie, quali le sindromi talassemiche è stata rivista di recente (32).

La diminuzione del contenuto medio di emoglobina reticolocitaria (CHR) è un parametro che misura la disponibilità di ferro funzionale per l'eritropoiesi dei 3-4 giorni precedenti. La sua riduzione è un segno precoce di eritropoiesi ferro-carente, come si può verificare dopo terapia con ESA. Il suo aumento può invece essere utilizzato per valutare una risposta precoce (2-4 giorni dopo l'inizio del trattamento) alla somministrazione endovenosa di ferro. La percentuale di eritrociti ipocromici è meno utile in questi contesti, in quanto meno precoce (24).

La carenza di ferro colpisce anche l'ultimo anello della sintesi dell'eme, l'incorporazione del ferro nell'anello protoporfirino da parte della ferrochelatasi, determinando un accumulo di protoporfirina IX e l'incorporazione nell'anello protoporfirino di zinco al posto del ferro. L'aumento di zinco protoporfirine eritrocitarie può essere utile come esame di screening per la sideropenia, da confermare con altri esami. In effetti, le protoporfirine dei globuli rossi possono aumentare in altre condizioni, ad esempio nel caso di anemia sideroblastica dovuta a difetto degli enzimi della via biosintetica dell'eme o nell'intossicazione da piombo, che può inibire l'attività degli stessi enzimi.

### EZIOLOGIA DELLA SIDEROPENIA

Tranne quando la sideropenia è chiaramente da riferirsi all'incremento delle richieste di ferro, i pazienti dovrebbero essere sottoposti al percorso diagnostico per la ricerca delle cause che hanno indotto la sideropenia, soprattutto se di sesso maschile o se donne in menopausa. Generalmente si tratta di numerose patologie intestinali causa di sanguinamenti cronici (anche occulti) o di malassorbimento. La causa del sanguinamento deve essere identificata,

eventualmente anche ricorrendo alla video-endoscopia soprattutto per esplorare il piccolo intestino nei casi negativi all'endoscopia convenzionale. La valutazione ginecologica è d'obbligo nelle donne con ipermenorrea o menometrorragie. Esami non invasivi come l'"urea breath test" o la ricerca di anticorpi per la presenza di *Helicobacter pylori* e di anticorpi anti-transglutaminasi nel sospetto di morbo celiaco devono sempre essere effettuati soprattutto nei casi refrattari alla terapia con ferro per via orale (10). Negli anziani sono importanti la determinazione della PCR e l'esclusione di condizioni infiammatorie e/o neoplastiche. In questi soggetti, a parte le carenze nutrizionali, sono spesso in gioco altre molteplici cause. L'eritropoiesi clonale è un evento che si verifica anche nell'invecchiamento fisiologico e predispone allo sviluppo di mielodisplasie o neoplasie ematologiche (33). L'emoglobinuria parossistica notturna o altre cause di emolisi intravascolare cronica dovrebbero essere ricercate in casi di sideropenia a eziologia oscura. Nel sospetto di IRIDA è indispensabile la determinazione dei livelli sierici di epcidina e/o la sequenza del gene *TMPRSS6*.

### NUOVE PROSPETTIVE NEL TRATTAMENTO MARZIALE

La prima linea di trattamento nell'anemia sideropenica è la somministrazione di ferro orale basato su sali di ferro (soprattutto ferro solfato). Il dosaggio tradizionalmente consigliato è di 100-200 mg di ferro elementare a digiuno, in dosi refratte (9). Effetti collaterali sono frequenti, probabilmente dovuti alle proprietà ossidanti del ferro sulla mucosa gastrointestinale, e sono più comuni con ferro orale che con placebo o ferro parenterale (34). Inoltre componenti della dieta o altri farmaci (antiacidi, antagonisti dei recettori H<sub>2</sub> e inibitori di pompa) interferiscono con l'assorbimento. Il ferro orale, se tollerato e assunto correttamente, corregge l'anemia nella maggior parte dei casi di vera carenza. Se sia in grado di correggere la carenza di ferro in altri organi (ad es., cuore, muscolo, cervello) è ancora in discussione. Preparazioni a lento rilascio non sono consigliate in quanto scarsamente assorbite.

Nei paesi in via di sviluppo dove le infezioni, soprattutto la malaria, sono frequenti, la sideropenia sembra un elemento protettivo e la correzione della

sideropenia deve essere perseguita con prudenza (35). La terapia per via orale non ha effetto in presenza di livelli elevati di epcidina che ne bloccano l'assorbimento.

L'unica alternativa disponibile al ferro orale è il ferro per via endovenosa (e.v.). Nuove preparazioni in commercio consentono di somministrare la quantità stimata necessaria a correggere il difetto di Hb e a ripristinare i depositi di ferro esauriti in un'unica somministrazione (36). La somministrazione di alte dosi di ferro e.v. sembra avere effetti positivi nello scompenso cardiaco congestizio migliorando la prestazione del paziente, la sua classe di severità e la qualità di vita, anche in assenza di anemia, in paragone con il trattamento placebo (16). L'ipotesi che il ferro e.v. corregga la carenza di ferro nei cardiomiociti e perché questa carenza evolva in scompenso cronico sono questioni interessanti e ancora aperte che richiedono ulteriori studi.

### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2014;123:615-24.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, et al. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24-38.
- Camaschella C, Hoffbrand AV, Hershko C. Iron metabolism, iron deficiency and disorders of haem synthesis. In: Hoffbrand AV, Higgs DR, Keeling DM, et al., eds. *Postgraduate haematology*, 7<sup>th</sup> ed. [e-book]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell 2016.
- Cable RG, Glynn SA, Kiss JE, et al. Iron deficiency in blood donors: analysis of enrollment data from the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. *Transfusion* 2011;51:511-22.
- Du X, She E, Gelbart T, et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 2008;320:1088-92.
- Mancias JD, Wang X, Gygi SP, et al. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* 2014;509:105-9.
- Bellelli R, Federico G, Matte A, et al. NCOA4 deficiency impairs systemic iron homeostasis. *Cell Rep* 2016;14:411-21.
- Mastrogiannaki M, Matak P, Peyssonnaud C. The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood* 2013;122:885-92.
- Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *New Engl J Med* 2015;372:1832-43.
- Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood* 2014;123:326-33.
- Khanbhai M, Dubb S, Patel K, et al. The prevalence of iron deficiency anaemia in patients undergoing bariatric surgery. *Obes Res Clin Pract* 2015;9:45-9.
- Choung RS, Ditah IC, Nadeau AM, et al. Trends and racial/ethnic disparities in gluten-sensitive problems in the United States: findings from the National Health and Nutrition Examination Surveys from 1988 to 2012. *Am J Gastroenterol* 2015;110:455-61.
- Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *New Engl J Med* 2005;352:1011-23.
- Maddougall IC, Bock AH, Carrera F, et al. FIND-CKD: a randomized trial of intravenous ferric carboxymaltose versus oral iron in patients with chronic kidney disease and iron deficiency anaemia. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:2075-84.
- van Veldhuisen DJ, Anker SD, Ponikowski P, et al. Anemia and iron deficiency in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:485-93.
- Anker SD, Comin Colet J, Filippatos G, et al. Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *New Engl J Med* 2009;361:2436-48.
- Silvestri L, Pagani A, Nai A, et al. The serine protease matrilysin-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008;8:502-11.
- Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008;40:569-71.
- Benyamin B, Esko T, Ried JS, et al. Novel loci affecting iron homeostasis and their effects in individuals at risk for hemochromatosis. *Nat Commun* 2014;5:4926.
- Gichohi-Wainaina WN, Towers GW, Swinkels DW, et al. Inter-ethnic differences in genetic variants within the transmembrane protease, serine 6 (TMPRSS6) gene associated with iron status indicators: a systematic review with meta-analyses. *Genes Nutr* 2015;10:442.
- Nai A, Pagani A, Silvestri L, et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood* 2011;118:4459-62.
- Kiss JE. Laboratory and genetic assessment of iron deficiency in blood donors. *Clin Lab Med* 2015;35:73-91.
- Sorensen E, Rigas AS, Thorner LW, et al. Genetic factors influencing ferritin levels in 14,126 blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion* 2016;56:622-7.
- Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* 2010;116:4754-61.
- Schwiebacher C, Serafin A, Zanon A, et al. Involvement of proprotein convertase PCSK7 in the regulation of systemic iron homeostasis. *Hepatology* 2013;58:1860-1.
- Infusino I, Braga F, Dolci A, et al. Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *Am J Clin Pathol* 2012;138:642-9.
- Braga F, Infusino I, Dolci A, et al. Soluble transferrin receptor in complicated anemia. *Clin Chim Acta* 2014;431:143-7.
- Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* 2016;127:2809-13.
- De Falco L, Sanchez M, Silvestri L, et al. Iron refractory iron deficiency anemia. *Haematologica* 2013;98:845-53.
- Infusino I, Dolci A, Panteghini M. Determinazione dell'epcidina: ma cosa stiamo "misurando"? *Biochim Clin* 2013;37:135-7.
- van der Vorm LN, Hendriks JC, Laarakkers CM, et al. Toward worldwide hepcidin assay harmonization: identification of a commutable secondary reference material. *Clin Chem* 2016;62:993-1001.
- DeLoughery TG. Microcytic anemia. *N Engl J Med* 2014;371:1324-31.
- Malcovati L, Cazzola M. The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of undetermined

- potential (CHIP). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015;2015:299-307.
34. Tolkien Z, Stecher L, Mander AP, et al. Ferrous sulfate supplementation causes significant gastrointestinal side-effects in adults: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 2015;10:e0117383.
  35. Sazawal S, Black RE, Ramsan M, et al. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2006;367:133-43.
  36. Auerbach M, Ballard H. Clinical use of intravenous iron: administration, efficacy, and safety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:338-47.

## Trombocitosi e rischio trombotico nelle neoplasie mieloproliferative

Cinzia Giaccherini, Marina Marchetti, Anna Falanga

Divisione di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

### ABSTRACT

**Thrombocytosis and risk of thrombosis in myeloproliferative neoplasms.** In patients with polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET), two Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), thrombotic events are frequent and represent the main cause of morbidity and mortality. Patients with MPN can be stratified in thrombotic risk categories according to age and history of thrombosis. Patients older than 60 years or with a history of thrombosis are considered at high-risk. Recently, new developments have brought to a further subcategorization of patients who are not at high risk in the "intermediate" and "low-risk" categories, depending on the presence or absence of *JAK2V617F* mutation and/or cardiovascular risk factors. Thrombocytosis is typical of these diseases, particularly of ET, but its role in the pathogenesis of thrombotic events is still controversial. So far, no study has demonstrated a statistically significant correlation between platelet count and thrombosis in either PV or ET patients. Paradoxically, extreme thrombocytosis (i.e., platelets  $>1500 \times 10^9/L$ ) is rather associated with hemorrhagic manifestations in patients with ET. Recent biological studies of circulating thrombotic markers performed to characterize the presence of a hypercoagulable state in patients with MPN have shown that platelet qualitative abnormalities, more than platelet count, are associated with hypercoagulability in these patients. Particularly, studies have demonstrated that platelets circulate in an activated status and possess a high prothrombotic potential. These findings suggest that in these diseases the control of platelet activation over the platelet count is an important goal of treatment strategies.

### INTRODUZIONE

La trombocitemia essenziale (TE) e la policitemia vera (PV), sono neoplasie mieloproliferative (NMP) Philadelphia-negative, un gruppo di disordini clonali della cellula staminale emopoietica, caratterizzati dalla proliferazione di una o più linee mieloidi (granulocitaria, eritroide, megacariocitaria, mastocitaria) e dalla presenza di mutazioni somatiche specifiche a carico dei geni che codificano per la chinasi Janus 2 (*JAK2*), la calreticulina (*CALR*) o il recettore della trombopoietina (*MPL*) (1). Queste 3 mutazioni sono patogeneticamente essenziali e si verificano in modo mutualmente esclusivo. La PV è associata alla mutazione somatica in *JAK2*, che nel 98% dei pazienti interessa l'esone 14 (*JAK2V617F*), mentre nel 2% interessa l'esone 12. Nei pazienti con TE invece la mutazione *JAK2V617F* si trova nel 60% dei pazienti, *CALR* nel 22% e *MPL* nel 3%. Il restante 15% sono pazienti "wild-type" per tutte 3 le mutazioni (triplici negativi). La PV è principalmente caratterizzata da un persistente aumento dei globuli rossi, dell'emoglobina e dell'ematocrito, mentre la TE si presenta tipicamente con

una conta piastrinica  $>400 \times 10^9/L$ , fino a livelli di  $1000-3000 \times 10^9/L$ . Sia PV che TE possono manifestare una marcata leucocitosi con neutrofilia.

L'aspettativa di vita dei pazienti affetti da PV o TE è fortemente influenzata dalle complicanze inerenti la loro malattia, che includono gli eventi trombo-emorragici e la trasformazione in mielofibrosi o in leucemia mieloide acuta. L'incidenza di queste complicanze è significativamente diversa tra le due malattie, ponendo i pazienti con PV a più elevato rischio di trombosi e di evoluzione in mielofibrosi o in leucemia rispetto ai pazienti con TE. Dati derivanti dallo studio collaborativo europeo sulla profilassi antitrombotica primaria con aspirina a basse dosi (100 mg/die) nella PV (ECLAP) hanno mostrato che la mortalità cardiovascolare rappresenta il 41% di tutte le morti in questa malattia (2).

### LE COMPLICANZE TROMBO-EMORRAGICHE NELLE NMP

Gli eventi trombo-emorragici sono in assoluto la principale causa di mortalità nei pazienti con NMP.

Corrispondenza a: Anna Falanga, Divisione di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, ASST Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS 1, 24127 Bergamo. Tel. 0352673663, Fax 0352674832, E-mail annafalanga@yahoo.com

Ricevuto: 08.02.2016

Revisionato: 04.04.2016

Accettato: 30.05.2016

Publicato on-line: 09.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.021

Nella PV, l'incidenza di trombosi è di 18 per 1000 pazienti/anno, mentre nella TE, l'incidenza di trombosi è di 12 per 1000 pazienti/anno. Le trombosi sono spesso il sintomo d'esordio della malattia, mentre la loro frequenza si riduce in maniera significativa nelle fasi successive, quando viene instaurato l'adeguato trattamento.

Le manifestazioni cliniche della trombosi possono variare da disturbi del microcircolo lievi, come eritromelalgia (eritema, calore e dolore alle estremità distali), prurito acquagenico, disturbi della visione e neurologici, fino a complicanze più gravi, quali le trombosi arteriose o venose dei grossi vasi. La trombosi arteriosa è più comune della trombosi venosa e può coinvolgere le arterie cerebrali, coronariche e periferiche. Le trombosi venose includono la trombosi venosa profonda degli arti inferiori, l'embolia polmonare, le tromboflebiti superficiali degli arti e le trombosi venose in siti inusuali, quali le trombosi viscerali e dei seni venosi cerebrali. Le trombosi in siti inusuali sono tipiche della NMP e sono spesso la prima manifestazione di una NMP occulta.

Gli eventi emorragici, rappresentati principalmente da epistassi, gengivorragia o emorragie del tratto gastroenterico, hanno un'incidenza molto più bassa rispetto agli eventi trombotici (0,33% paziente/anno) e si manifestano principalmente in presenza di trombocitosi severa (piastrine  $>1500 \times 10^9/L$ ).

### FATTORI DI RISCHIO PER COMPLICANZE TROMBO-EMORRAGICHE NELLE NMP

Nel corso degli ultimi anni, l'età avanzata ( $>60$  anni) e la storia di trombosi sono stati identificati come i più importanti fattori di rischio trombotico sia nella PV che nella TE; la presenza di uno dei due identifica i pazienti ad alto rischio distinguendoli da quelli a basso rischio (3). Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato il valore prognostico dei fattori di rischio cardiovascolare e della mutazione JAK2V617F. Quest'ultima in particolare appare rilevante nella TE, in quanto si associa a un più alto rischio trombotico rispetto alla mutazione CALR o allo stato mutazionale triplo negativo (4). Alla luce di queste scoperte, i pazienti tradizionalmente considerati a basso rischio (età  $<60$  anni e senza storia di trombosi) sono oggi ulteriormente categorizzati in "rischio intermedio" o "basso rischio", a seconda che siano presenti o meno tali fattori di rischio aggiuntivi (Figura 1) (5-7). Comprendere il livello di rischio trombotico di questi pazienti è molto importante, poiché l'aspettativa di vita dei pazienti con PV e TE è fortemente influenzata dalle complicanze trombotiche. Pertanto è importante decidere quando iniziare o meno la terapia, il cui obiettivo primario è quello di ridurre tali complicanze.

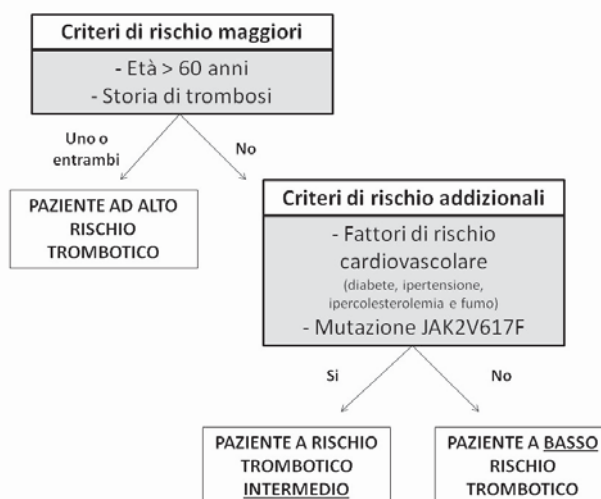
Fanno parte dell'armamentario terapeutico di queste malattie i farmaci antiaggreganti (aspirina o ticlopidina, più raramente clopidogrel) e i farmaci citoriduttivi, che comprendono l'idrossiurea, un antimetabolita globale della mielopoiesi, l'anagrelide, un derivato chinazolinico che inibisce selettivamente la maturazione dei megacariociti, l'interferone  $\alpha$ , in grado di sopprimere la mielopoiesi e in particolare la megacariocitopoiesi, e

infine il busulfano. Tra questi l'anagrelide è l'unico farmaco che riduce in modo selettivo le piastrine. Nei pazienti con PV a basso rischio vengono utilizzati il salasso, con lo scopo di raggiungere un valore di ematocrito  $<0,45 L/L$ , e la profilassi con aspirina a basso dosaggio (100 mg/die). I pazienti con TE a basso rischio, in assenza di altri fattori (mutazione JAK2V617F o fattori di rischio cardiovascolare), rimangono sotto la sola osservazione clinica, ma se sono presenti uno o entrambi i suddetti fattori si considera l'uso della profilassi con aspirina a basse dosi. Infine, nei pazienti sia con TE che con PV ad alto rischio è indicata la terapia citoriduttiva con idrossiurea in prima linea o con interferone  $\alpha$  ( $<65$  anni) o busulfano ( $\geq 65$  anni) in seconda linea, in associazione con aspirina 100 mg/die e con salassi nei pazienti con PV (7, 8). L'anagrelide è consigliata nei casi con TE resistenti all'idrossiurea.

È importante sottolineare che la trombocitosi severa ( $>1500 \times 10^9/L$ ) si associa a una diatesi emorragica. Questo paradosso è stato attribuito all'insorgenza di una forma acquisita di malattia di von Willebrand, causata da un'aumentata "clearance" dei multimeri ad alto PM del fattore di von Willebrand (vWF) dal plasma (9). Pertanto, nei pazienti con piastrine  $>1500 \times 10^9/L$  la somministrazione di aspirina è assolutamente sconsigliata soprattutto in presenza di un'attività del cofattore ristocetinico, espressione dell'attività del vWF,  $<30\%$  (3).

### STATO DI IPERCOAGULABILITÀ NELLE NMP

Anche in assenza di trombosi manifesta, i pazienti con PV e TE sono caratterizzati da uno stato di ipercoagulabilità cronica, come dimostrato dal



**Figura 1**

*Classificazione dei pazienti con neoplasie mieloproliferative in categorie di rischio trombotico.*

*I pazienti con trombocitemia essenziale e policitemia vera sono stratificati in categorie di rischio a seconda della loro età e della storia di trombosi. Altri fattori di rischio aggiuntivi permettono di classificare ulteriormente i pazienti non ad alto rischio in intermedio e basso rischio.*

persistente riscontro di elevate concentrazioni plasmatiche di marcatori di attivazione della coagulazione (complesso trombina/antitrombina, frammento protrombotico 1+2 e D-dimero) e dell'endotelio (trombomodulina e complessi vWF/fattore VIII). Si può quindi affermare che in questi pazienti, inclini a complicanze vascolari, è presente uno stato di trombofilia acquisita, ma i meccanismi responsabili in ultima analisi dell'attivazione della coagulazione del sangue e dell'aumento della tendenza alla trombosi nella TE e PV sono ancora oggetto di intense ricerche. Tra i vari meccanismi proposti, un ruolo importante viene attribuito all'aumento della viscosità ematica, al numero e allo stato di attivazione dei leucociti e delle piastrine e alle perturbazioni dell'endotelio vascolare.

### TROMBOCITOSI E RISCHIO TROMBOTICO

Il ruolo della trombocitosi, tipica della TE ma di riscontro frequente anche nella PV, nella patogenesi degli eventi trombotici in pazienti con NMP è tuttora controverso.

A favore dell'ipotesi che la trombocitosi sia responsabile dell'aumentata incidenza di complicanze trombotiche nelle NMP vi sono le evidenze cliniche che dimostrano come la riduzione della trombocitosi, insieme alla riduzione della leucocitosi e dell'ematocrito, a opera di farmaci citoriduttivi come l'idrossiurea, riduca l'incidenza di trombosi e di complicanze vascolari nei pazienti con TE ad alto rischio (10). Tuttavia, uno studio prospettico randomizzato più recente condotto in pazienti con TE ad alto rischio per confrontare l'efficacia di due diversi farmaci citoriduttivi a diverso meccanismo d'azione (idrossiurea vs. anagrelide) ha dimostrato che, malgrado un controllo paragonabile della conta piastrinica, l'anagrelide si dimostrava meno efficace dell'idrossiurea nel ridurre l'"endpoint" primario combinato (trombosi arteriosa o venosa, grave emorragia o morte per cause vascolari) (11). Questi dati evidenziano che la riduzione della sola conta piastrinica non è sufficiente a fornire un'adeguata protezione dagli eventi trombotici nei pazienti ad alto rischio e che la riduzione dell'incidenza di trombosi osservata nello studio precedente (10) era legata all'effetto citoriduttivo dell'idrossiurea, oltre che sulle piastrine, anche sulle altre popolazioni cellulari del sangue, in particolare sui leucociti.

A dimostrazione che la trombocitosi di per sé non rappresenta un fattore di rischio per trombosi vi sono i risultati di alcuni studi, sia prospettici che retrospettivi, condotti in pazienti con PV e TE (12-14). Per esempio, nello studio ECLAP, un ampio studio prospettico randomizzato per valutare l'efficacia della profilassi primaria con aspirina in pazienti con PV, né il livello di piastrine di  $400 \times 10^9/L$ , attualmente proposto come "target" terapeutico, né altre soglie di conta piastrinica si sono rivelate in grado di predire un alto rischio di trombosi o di mortalità (12). Similmente, nella TE l'analisi di studi di coorte prospettici che avevano arruolato almeno 100 pazienti ha fallito nel dimostrare una chiara

associazione fra conta piastrinica e trombosi (13). Infine, un ulteriore studio retrospettivo di una coorte di 99 pazienti giovani con TE (età <60 anni) e trombocitosi severa non ha evidenziato differenze nell'incidenza di eventi trombotici maggiori fra i soggetti che ricevevano terapia citoriduttiva e quelli che non la ricevevano (14), supportando le attuali raccomandazioni di non utilizzare la terapia con idrossiurea in questo tipo di pazienti.

A supporto di questa mancata correlazione fra valori elevati della conta piastrinica e trombosi, vi sono due studi che dimostrano che la trombocitosi può avere un ruolo protettivo nei confronti del rischio trombotico (15, 16). Nel primo di questi studi, condotto su 1179 pazienti con NMP arruolati prospetticamente per il trattamento con anagrelide, un'elevata conta piastrinica alla diagnosi si associava a una minore incidenza di eventi trombotici durante il "follow-up". Lo stesso studio dimostrava inoltre che la conta piastrinica è criticamente importante se misurata in prossimità dell'evento trombotico: i pazienti che sviluppavano trombosi avevano infatti valori mediani di conta piastrinica più elevati prima dell'evento e questo era significativo per tutti i tipi di eventi trombotici, sia arteriosi che venosi che del microcircolo (15). Il secondo studio, riguardante il ruolo della leucocitosi nello sviluppo di trombosi in pazienti con NMP, aveva inoltre rivelato che una conta piastrinica  $>1000 \times 10^9/L$  era significativamente associata con un minor rischio trombotico, indipendentemente dalla leucocitosi (16).

Come precedentemente riportato, una conta piastrinica estremamente alta ( $>1500 \times 10^9/L$ ) diventa al contrario un fattore di rischio emorragico. L'uso della terapia citoriduttiva in questi casi particolari riduce significativamente il rischio di sanguinamento (10, 17).

### ALTERAZIONI DELLA FUNZIONE PIASTRINICA NEI PAZIENTI CON NMP

Nonostante i dati incerti sul ruolo della trombocitosi, molte sono le evidenze sperimentali che supportano un contributo delle piastrine nella patogenesi delle complicanze trombotiche e dei disturbi del microcircolo nei pazienti con NMP. In questo senso, è la funzionalità piastrinica, più che la conta piastrinica, ad avere un ruolo chiave. A sostegno di ciò, lo studio ECLAP ha dimostrato una significativa riduzione, pari al 60% ( $P < 0,03$ ), dell'"endpoint" combinato di infarto del miocardio non fatale, ictus non fatale, embolia polmonare, trombosi venosa maggiore o morte per cause cardiovascolari nei pazienti con PV che ricevevano profilassi antitrombotica con aspirina, dimostrando l'efficacia dell'inibizione della funzionalità piastrinica nel ridurre il rischio di trombosi in questi pazienti (12). Inoltre, la stessa profilassi risulta efficace nell'alleviare i sintomi dei disturbi microvascolari nei pazienti con trombocitosi (18).

La funzionalità piastrinica nei pazienti con TE e PV è stata valutata in numerosi studi mediante una varietà di metodiche sia *in vitro* che *ex vivo*. I risultati di queste ricerche sono tuttavia contrastanti. I primi studi condotti in questi pazienti hanno descritto difetti dell'aggregazione piastrinica, ridotta espressione delle

molecole di adesione sulla membrana piastrinica (GPIIb, GPIIb-IIIa, GPIV e GPVI), un difetto acquisito da "storage pool" e un metabolismo alterato dell'acido arachidonico, suggestivi nel loro complesso di una ridotta funzionalità piastrinica (19, 20). Diversamente, gli studi più recenti dimostrano che le piastrine circolano in uno stato attivato nei pazienti con TE e PV (21, 22), come evidenziato dall'aumentata espressione sulla loro superficie di P-selettina, una proteina degli  $\alpha$  granuli che media l'adesione delle piastrine all'endotelio e ai leucociti, e di fattore tissutale, il principale attivatore della cascata coagulativa. L'attivazione *in vivo* delle piastrine è dimostrata anche dal riscontro di aumentati livelli di prodotti di derivazione piastrinica sia nel plasma ( $\beta$ -tromboglobulina e fattore piastrinico 4) che nelle urine [metaboliti del trombossano A2 (TxB2): 11-diidro-TxB2 e 2,3-dinor-TxB2] e di aggregati neutrofilo/piastrine nel circolo ematico (22-24).

Infine, i pazienti con TE e PV, soprattutto quelli portatori della mutazione JAK2V617F, presentano conte più elevate di piastrine immature (IPF), sensibili alla terapia citoriduttiva con idrossiurea (25). Le IPF sono piastrine giovani, appena rilasciate in circolo dal sangue midollare, ritenute emostaticamente più attive di quelle mature. L'effetto dell'idrossiurea sulle IPF potrebbe quindi rappresentare un meccanismo aggiuntivo con cui il farmaco contribuisce alla riduzione del rischio trombotico in questi pazienti.

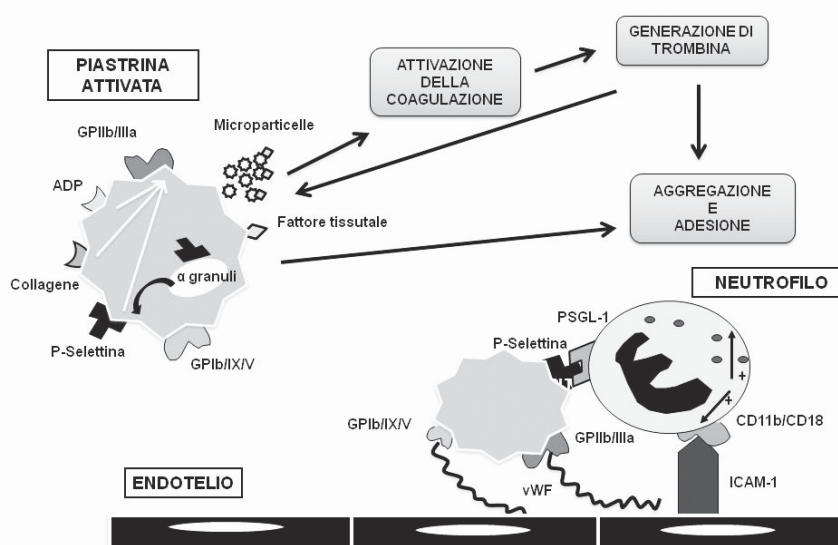
Le piastrine partecipano all'attivazione della coagulazione attraverso vari meccanismi, come mostrato nella Figura 2. L'esposizione sulla superficie esterna della membrana plasmatica di fosfolipidi anionici (fosfatidilserina) da parte delle piastrine attivate, per esempio, fornisce una superficie catalitica per la generazione di trombina (26); le microparticelle

procoagulanti liberate dalle piastrine a loro volta amplificano l'attivazione della coagulazione essendo portatrici sulla loro membrana di fattore tissutale e fosfatidilserina (27). Infine, la P-selettina esposta sulla superficie delle piastrine favorisce l'interazione con i leucociti e con le microparticelle generate dalle altre cellule vascolari, portando alla formazione di microtrombi a elevato potenziale procoagulante (28).

I risultati di esperimenti *in vitro* condotti recentemente nel nostro laboratorio dimostrano che le piastrine dei pazienti con TE e PV presentano un aumentato potenziale adesivo al collagene in condizioni di flusso. Gli stessi esperimenti dimostrano anche che le piastrine adese espongono sulla loro superficie quantità inferiori di fosfatidilserina procoagulante rispetto alle piastrine di controllo; quindi, nonostante siano in grado di formare trombi più grandi, le piastrine di questi pazienti presentano un'attività procoagulante inferiore. Questo fenomeno potrebbe essere legato all'attivazione costitutiva delle piastrine che si osserva frequentemente *in vivo* e che può determinare un esaurimento della loro attività procoagulante. A ulteriore supporto di questa ipotesi, vi sono esperimenti che dimostrano come le piastrine isolate da pazienti con TE e stimulate *in vitro* rilasciano microparticelle funzionalmente meno attive e in numero inferiore rispetto a quelle di controllo (dati non pubblicati).

## CONCLUSIONI

La trombocitosi può contribuire allo sviluppo delle complicanze trombotiche nei pazienti con NMP, dato che la citoriduzione piastrinica riduce il rischio di trombosi ricorrente nei pazienti ad alto rischio. Tuttavia, l'assenza di correlazione tra i diversi livelli di incremento delle



**Figura 2**

Alterazioni emostatiche delle piastrine e patogenesi dell'attivazione della coagulazione nei pazienti con neoplasie mieloproliferative. vWF, fattore von Willebrand; ADP, adenosina difosfato; CD, "cluster" di differenziazione; PSGL-1, ligando della glicoproteina P-selectina-1; ICAM-1, molecola di adesione intercellulare-1; GP, glicoproteina.

piastrine e la trombosi in queste patologie, insieme all'assenza di complicanze trombotiche nei casi di trombocitosi reattiva, rendono improbabile il fatto che la trombocitosi di per sé, nei pazienti con TE e PV, abbia una relazione causale con gli eventi trombotici. In questo scenario, il beneficio della terapia citoriduttiva può essere sì dovuto alla riduzione delle piastrine ma, verosimilmente, anche a un effetto complessivo degli agenti mielosoppressivi sui globuli bianchi e globuli rossi e sulla funzionalità endoteliale. L'idrossiurea agisce infatti diminuendo il numero di leucociti che contribuiscono alla risposta procoagulante sui siti di danno vascolare e come donatore di ossido nitrico (29-31).

La funzionalità delle piastrine, che nei pazienti con NMP circolano in uno stato costitutivamente attivato, sembra giocare un ruolo preponderante nello sviluppo di eventi trombotici. Tuttavia, malgrado vi siano molte evidenze sperimentali, a oggi non è stato possibile rilevare una correlazione tra la valutazione *ex vivo* della funzione piastrinica e gli eventi trombotici. La mancanza di tale relazione potrebbe essere legata alla presenza in queste patologie di anomalie piastriniche multiple, coesistenti nello stesso paziente, alla variazione di queste anomalie durante il corso della malattia (eventualmente legate alla generazione di subcloni alterati oppure come conseguenza delle terapie) e al contributo di altri attori, quali leucociti e cellule endoteliali. Ulteriori studi sono necessari per comprendere il ruolo causale di un'attivazione permanente di queste cellule.

### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24:1128-38.
- Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004;350:114-24.
- Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2015;90:162-73.
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014;123:1552-5.
- Vannucchi AM. Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Intern Emerg Med* 2010;5:177-84.
- Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood* 2013;122:2176-84.
- Tefferi A, Barbui T. Essential thrombocythemia and polycythemia vera: focus on clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2015;90:1283-93.
- Tefferi A, Barbui T. New and treatment-relevant risk stratification for thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol* 2015;90:683-5.
- Budde U, van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:425-31.
- Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995;332:1132-6.
- Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005;353:33-45.
- Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, et al. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol* 2007;136:249-59.
- Finazzi G, Barbui T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia* 2008;22:1494-502.
- Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93:1645-51.
- Schwarz J, Ovesna P, Cerna O, et al. Thrombosis in thrombocytopenic Ph- myeloproliferations is associated with higher platelet count prior to the event: results of analyses of prothrombotic risk factors from a registry of patients treated with anagrelide. *Eur J Haematol* 2016;96:98-106.
- Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, et al. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood* 2009;114:759-63.
- Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006;107:4214-22.
- Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, et al. Platelet-mediated erythromelalgic, cerebral, ocular and coronary microvascular ischemic and thrombotic manifestations in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera: a distinct aspirin-responsive and coumadin-resistant arterial thrombophilia. *Platelets* 2006;17:528-44.
- Landolfi R, Rocca B, Patrono C. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;20:203-22.
- Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* 1984;64:1-12.
- Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, et al. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006;91:169-75.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005;33:523-30.
- Jensen MK, de Nully Brown P, Lund BV, et al. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2000;110:116-24.
- Landolfi R, Ciabattini G, Patrignani P, et al. Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. *Blood* 1992;80:1965-71.
- Panova-Noeva M, Marchetti M, Buoro S, et al. JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinants of immature platelet parameters in essential thrombocythemia and polycythemia vera patients. *Blood* 2011;118:2599-601.

26. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol* 2011;86:337-42.
27. Marchetti M, Tartari CJ, Russo L, et al. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2014;89:68-73.
28. van Rooy MJ, Pretorius E. Platelet interaction with erythrocytes and propensity to aggregation in essential thrombocythaemia. *Lancet* 2016;387:1210.
29. Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol* 2001;8:263-9.
30. Nahavandi M, Tavakkoli F, Wyche MQ, et al. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Br J Haematol* 2002;119:855-7.
31. Cella G, Marchetti M, Vianello F, et al. Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Haemost* 2010;104:151-6.

## Il ruolo del laboratorio di citogenetica in oncoematologia

Ursula Giussani, Alessandra Pansa

Laboratorio di Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

### ABSTRACT

**The role of cytogenetic laboratory in the hemato-oncologic disorders.** Conventional cytogenetic studies provide a global overview of acquired genetic changes in hematological malignancies. Some specific cytogenetic abnormalities are closely, sometimes uniquely, associated with morphological and clinical distinct subsets of leukemia or lymphoma, as well as with their prognosis. Fluorescence *in situ* hybridization and comparative genomic hybridization array have improved the power of cytogenetic analysis and are used as a complementary tool in the definition of chromosomal aberrations. The innovative technical advances in the field of genetics, especially the deep-sequencing technique, has brought to new insights in carcinogenesis and to the discovery of new cancer genes, becoming a powerful tool for diagnostic and therapy of hematologic malignancies. Genetic testing plays today a crucial role in the diagnostic process: it helps to classify disease in specific entities, it provides predictive information and it can be used for clinical management and therapy. The goal of the cytogenetic laboratory is to apply the proper strategies, depending on the clinical question and disease phase (presentation, monitoring, relapse).

### INTRODUZIONE

L'idea che le alterazioni citogenetiche avessero un ruolo rilevante nell'iniziazione della carcinogenesi scaturì dall'identificazione nel 1960 da parte di Nowell e Hungerford di un marcatore cromosomico acquisito, il cromosoma Philadelphia (Ph), nei pazienti con leucemia mieloide cronica (1). Nonostante questa scoperta avesse generato grande interesse e speranze nel campo della citogenetica oncologica e fosse attesa l'identificazione di altri marcatori genetici significativi, le aberrazioni riscontrate nel corso di tutto il decennio successivo si dimostrarono eterogenee e non specifiche di un determinato tipo di tumore, generando anche il dubbio che le mutazioni acquisite fossero non la causa, ma la conseguenza del cancro (2). Il cromosoma Ph rimase così l'unico esempio consolidato di un'anomalia con ruolo patogenetico.

Con l'avvento delle tecniche di bandeggio, negli anni '70, divenne possibile studiare la struttura dei cromosomi sulla base del "pattern" di bande ottenuto con diverse tecniche di colorazione (3). Furono così identificati un gran numero di riarrangiamenti specifici, associati a un determinato tipo di neoplasia, che fino a quel momento non era stato possibile riconoscere. Per citarne alcuni: la t(8;14) nel linfoma di Burkitt (4), la t(8;21) nella leucemia

mieloide acuta (5), la t(15;17) nella leucemia promielocitica (6), la delezione 20q nella policitemia vera (7), la delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 5 nelle mielodisplasie (8) e la t(9;22) che si dimostrò essere il riarrangiamento che sottendeva la presenza del cromosoma Ph (9). La citogenetica divenne uno strumento diagnostico utile in oncoematologia per la classificazione delle neoplasie, anche se fu presto chiaro che non tutte le aberrazioni avevano un significato egualmente importante.

Negli anni '80 l'avvento delle tecniche molecolari permise di scoprire i due principali meccanismi attraverso i quali i riarrangiamenti esercitano la loro azione: la deregolazione di oncogeni, dovuta alla traslocazione di un oncogene in un dominio trascrizionalmente attivo, e la formazione di geni di fusione (Figura 1). Per esempio, nella traslocazione t(8;14) l'oncogene *MYC* (8q) viene posizionato vicino agli elementi regolatori del gene dell'immunoglobulina *IGH* (14q), che ne influenzano la trascrizione aumentando l'espressione; nella traslocazione t(9;22), invece, la regione codificante 3' del gene *ABL* (9q34) viene posizionata al 5' del gene *BCR* (22q11) generando un gene di fusione il cui trascritto *Bcr/Abl* codifica per una proteina chimerica (10).

Negli stessi anni venne sviluppata la tecnica

Corrispondenza a: Ursula Giussani, Laboratorio di Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS 1, 24127 Bergamo. Tel. 0352674687, Fax 0352674915, E-mail [ugiusani@asst-pg23.it](mailto:ugiusani@asst-pg23.it)

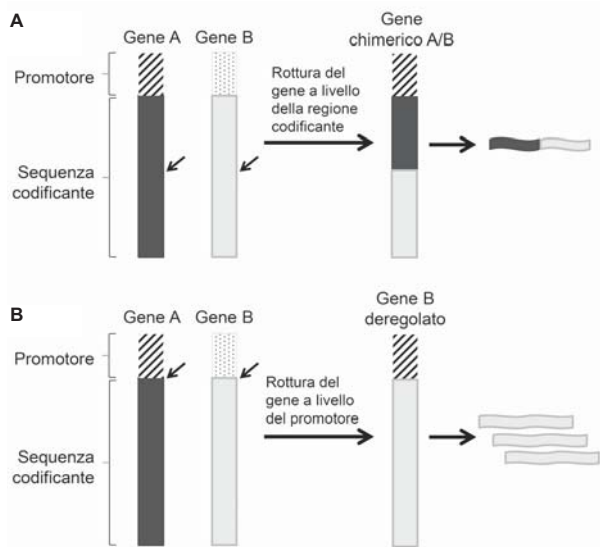
Ricevuto: 02.03.2016

Revisionato: 25.05.2016

Accettato: 29.07.2016

Pubblicato on-line: 11.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.024



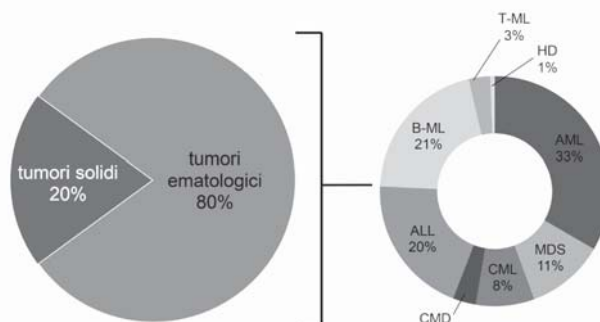
**Figura 1**  
 Effetti dei riarrangiamenti cromosomici alla base delle fusioni geniche. A) Formazione di un gene chimerico: la fusione di parti di due geni, A e B, ai punti di rottura del riarrangiamento produce un gene ibrido che codifica per una proteina chimerica con alterata attività. B) Deregolazione: la trasposizione della sequenza codificante di un oncogene B in un dominio sotto l'influenza del promotore di un gene A trascrizionalmente attivo causa una alterata regolazione con sovraespressione dell'oncogene. Le fusioni geniche possono originare attraverso riarrangiamenti cromosomici bilanciati e sbilanciati che includono: traslocazioni, inversioni, delezioni, inserzioni.

dell'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), ponte tra la citogenetica classica e la biologia molecolare, che permise l'identificazione diretta su cromosomi o nuclei della presenza/assenza di un determinato gene o di un riarrangiamento genico (11).

La caratterizzazione dei geni coinvolti nei riarrangiamenti citogenetici ha portato all'identificazione di centinaia di geni e l'enorme mole di dati sulle aberrazioni citogenetiche cancro-correlate è raccolta a scopo clinico diagnostico nel "Mitelman database of chromosome aberrations in cancer", che comprende neoplasie ematologiche mieloidi e linfoidi, linfomi a cellule B e T, e tumori solidi (Figura 2) (12).

**CITOGENETICA CONVENZIONALE**

Da oltre 40 anni, l'analisi citogenetica viene utilizzata nell'ambito delle patologie emolinfopoietiche, fornendo parametri diagnostici e prognostici largamente utilizzati nella pratica clinica, grazie anche alla facilità di ottenere materiale da analizzare e all'utilizzo di metodiche standardizzate (13). In corso di malattia oncematologica, il materiale di elezione è l'aspirato midollare o il sangue periferico infiltrato con i quali vengono allestite colture non stimolate per 24-72 ore. Le metafasi sono ottenute dopo aggiunta di colchicina e sgocciolamento della sospensione cellulare dopo trattamento con soluzione ipotonica seguito da una serie



**Figura 2**  
 Frequenza delle anomalie cromosomiche nei tumori e nelle neoplasie ematologiche. I dati sono ricavati da circa 45.500 neoplasie con anomalie riscontrate con la diagnosi citogenetica riportate in letteratura (10). L'elevata percentuale di anomalie riscontrata nei tumori ematologici (80%) è imputabile al maggior numero di studi condotti in questo settore. ALL, leucemia linfoblastica acuta; AML, leucemia mieloide acuta; B-ML, neoplasie a cellule B mature; CMD, malattie mieloproliferative croniche; CML, leucemia mieloide cronica; HD, linfoma di Hodgkin; MDS, sindromi mielodisplastiche; T-ML, neoplasie a cellule T mature.

di fissativi (14).

L'analisi citogenetica convenzionale permette una valutazione "genome-wide" (GW) delle anomalie delle cellule tumorali ed è quindi, da un certo punto di vista, l'analisi che meglio consente di studiare le caratteristiche di una particolare popolazione in attiva proliferazione spontanea *in vivo*.

Lo scopo dell'analisi citogenetica è riconoscere le anomalie primarie che sono generalmente causa della trasformazione maligna. Le aberrazioni riconosciute come eventi leucemogeni primari sono per lo più riarrangiamenti bilanciati, senza perdita o acquisto di materiale (traslocazioni, inversioni) e, meno frequentemente, delezioni, isocromosomi, derivativi da traslocazioni sbilanciate con perdita o acquisto di materiale. Anomalie secondarie che appaiono invece durante il corso della malattia possono essere aspecifiche in alcuni casi o precedere la progressione, diventando quindi marcatori prognostici (ne è un esempio l'isocromosoma 17, la cui comparsa è correlata a crisi blastica nella leucemia mieloide cronica) (15).

Sebbene l'analisi del cariotipo rivesta un ruolo centrale in qualsiasi laboratorio di citogenetica, è a volte difficoltoso ottenere le corrette informazioni sulla costituzione cromosomica delle cellule tumorali. La sensibilità dell'analisi citogenetica su campioni oncoematologici è infatti influenzata da alcune peculiarità del tessuto stesso, quali la coesistenza nello stesso campione di cellule tumorali e cellule normali, la presenza di linee cellulari geneticamente differenti (eterogeneità intratumorale), la possibilità che alcune anomalie siano confinate a particolari tipi cellulari (ad es., plasmacellule) caratterizzati da basso indice mitotico. Si rende quindi necessario l'utilizzo di specifiche strategie analitiche e preanalitiche (scelta del

campione di elezione, tempi di coltura, stimolatori di crescita, tecniche di immuno-separazione e arricchimento) per ottenere risultati rappresentativi dello stato della malattia. In aggiunta, la presenza di microdelezioni/microduplicazioni criptiche e riarrangiamenti complessi possono rimanere indecifrabili anche per un citogenetista esperto a causa dei limiti dell'analisi stessa (risoluzione di ~5-10 megabasi) o della bassa risoluzione del bandeggio che spesso contraddistingue i cromosomi della cellula tumorale.

La FISH viene in questi casi integrata nel percorso di diagnosi citogenetica, in quanto in grado di identificare la presenza di un determinato gene, di riarrangiamenti strutturali specifici e di piccole delezioni (13).

### FISH

La FISH è una tecnica che ha permesso di aumentare sensibilmente l'accuratezza diagnostica: essa non sostituisce l'analisi convenzionale, ma aggiunge informazioni specifiche e complementari contribuendo sia a una più precisa definizione del cariotipo, sia all'identificazione di specifiche anomalie anche in assenza di metafasi. Questa tecnica è utilizzata frequentemente nei laboratori di diagnosi per la ricerca o conferma di traslocazioni ricorrenti, inversioni, delezioni, duplicazioni, caratterizzazione di cromosomi marcatori e di "breakpoint" cromosomici (13).

La FISH si basa sulla capacità del DNA di denaturarsi in modo reversibile e prevede l'ibridazione tra una sonda di DNA marcata con un fluorocromo e la sequenza "target" specifica complementare, che potrà essere così visualizzata come un segnale fluorescente direttamente su un cromosoma o su nuclei in interfase (16).

Per l'analisi citogenetica molecolare sono oggi disponibili molte sonde commerciali marcate CE, che rendono accessibile a tutti i laboratori questa tecnologia: sonde centromeriche che si ibridano a sequenze  $\alpha$  e  $\beta$  satellite, usate per evidenziare trisomie e monosomie e anomalie della ploidia, sonde *locus* specifiche usate per l'identificazione di delezioni, amplificazioni o riarrangiamenti di un gene, e sonde specifiche a due colori per la ricerca di riarrangiamenti. In quest'ultimo caso, le sonde possono essere di due tipi: "dual colour-dual fusion" e "dual color break apart". Per lo studio delle traslocazioni ricorrenti di geni partner noti (ad es., *BCR/ABL*, *PML/RARA*) si utilizzano le sonde "dual colour-dual fusion" di diverse centinaia di kilobasi, che si estendono a cavallo dei punti di rottura della traslocazione di entrambi i geni coinvolti, ciascuna marcata con un fluorocromo diverso. In una cellula positiva saranno visibili un segnale per ciascun allele "wild-type" e due segnali di fusione, uno per il gene di fusione e uno per il prodotto reciproco della traslocazione. Per lo studio dei riarrangiamenti che coinvolgono geni che hanno più partner di fusione (ad es., *KMT2A*, *RARA*, *ETV6*) (elenco aggiornato in <http://atlasgeneticsoncology.org>) si utilizzano sonde "dual color break apart" costituite da due sonde marcate con fluorocromi differenti che ibridano rispettivamente al

5' e al 3' del "breakpoint" di traslocazione del medesimo gene, la cui rottura sarà visibile come separazione dei due segnali.

Per la diagnosi di riarrangiamenti complessi vengono utilizzate anche tecniche quali "multicolor-FISH" e "multicolor banding", evoluzioni della FISH, che si avvalgono dell'utilizzo di varie combinazioni di sonde e fluorocromi e sofisticati "software" per la visualizzazione dei colori lungo l'asse del cromosoma (17).

La ricerca dei trascritti prodotti dai geni di fusione può essere facilmente condotta utilizzando tecniche di biologia molecolare, come la reazione a catena della polimerasi (PCR). Sebbene tali metodiche siano più sensibili rispetto all'analisi FISH, è indispensabile rimarcare che il massimo della prestazione diagnostica si ottiene in moltissimi casi dall'integrazione dei dati dei laboratori di citogenetica, FISH e genetica molecolare, così come indicato da linee guida e raccomandazioni nazionali e internazionali (13).

In alcuni casi è importante la strategia di scelta della metodica: ad esempio, nel caso di una fusione genica risultante da traslocazione con "breakpoint" variabili lungo il gene coinvolto, la PCR non è la tecnica di elezione al contrario della FISH che, con l'utilizzo di sonde che si estendono esternamente alla regione coinvolta, risulta in grado di identificare il riarrangiamento, qualsiasi punto di rottura venga coinvolto (ad es., riarrangiamenti di *PDGFRA* o *KMT2A*). Inoltre, la presenza di anomalie aggiuntive o riarrangiamenti varianti, identificabili con l'analisi cromosomica o con la FISH, aggiunge spesso importanti informazioni all'analisi molecolare sia nella diagnosi che nel monitoraggio di alcune patologie.

### CARIOTIPO MOLECOLARE

La possibilità di aumentare il livello di risoluzione del cariotipo è offerta dall'ibridazione genomica comparativa su "array" ("CGH-array"), che nell'ultimo decennio si è affermata soprattutto nella diagnosi di anomalie genetiche costituzionali. Si tratta di una metodica di citogenetica molecolare GW in grado di valutare sbilanciamenti (perdita e acquisto di materiale genetico) con un limite di risoluzione fino a poche decine di kilobasi e quindi enormemente superiore alla risoluzione citogenetica (5-10 megabasi).

La metodica si basa sull'ibridazione competitiva di un DNA da testare (in questo caso, il DNA tumorale) e un DNA di controllo, marcati rispettivamente con due fluorocromi diversi, a un set di sequenze "target" complementari dell'intero genoma e adese a un supporto ("array"). Differenti tipi di piattaforme sono attualmente disponibili per l'analisi clinica. A seconda della tipologia di sonda utilizzata, esse si differenziano in "CGH-array" basati su cromosomi artificiali batterici (BAC), "CGH-array" basati su oligonucleotidi (oligo), "CGH-array" basati su polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e "CGH-array" oligo più SNP. Questi ultimi, contenenti entrambi i tipi di sonde, sono in grado di rilevare, in un unico esperimento, sia variazioni nel

numero di copie che perdite di eterozigotità. Regioni acquisite di omozigotità, possono mascherare mutazioni puntiformi in geni oncosoppressori e sono quindi importanti indicatori per successivi approfondimenti con tecniche di biologia molecolare. Il disegno della piattaforma "microarray" può essere mirato ("targeted") a regioni specifiche del genoma le cui alterazioni sono associate a tumore, GW con una distribuzione omogenea delle sonde sull'intero genoma o GW + "targeted", con una distribuzione variabile delle sonde tra genoma e regioni di interesse. La risoluzione dipenderà quindi dal tipo e numero di sonde adese, dalla lunghezza delle sonde e dalla loro densità, e la strategia di scelta dipenderà dalle caratteristiche della patologia in studio (18, 19).

Sebbene il cariotipo molecolare abbia permesso di identificare un enorme numero di nuovi sbilanciamenti, il trasferimento delle informazioni alla clinica procede con lentezza e l'applicazione in diagnosi è ancora limitata ad alcune patologie nelle quali gli sbilanciamenti risultano essere le anomalie più frequenti, quali le mielodisplasie o le leucemie linfatiche croniche (20, 21). Con questa tecnica non è infatti possibile identificare i riarrangiamenti bilanciati, che sono spesso gli eventi primari in oncematologia; inoltre, rimangono ancora problematici gli aspetti connessi al mosaicismo a bassa rappresentatività e all'interpretazione di molti polimorfismi rilevati. In un campione tumorale, infatti, la coesistenza di cloni neoplastici geneticamente differenti con cellule normali (mosaicismo) rende difficoltosa l'identificazione delle variazioni genomiche e delle frazioni cellulari in cui esse sono presenti, con il rischio di non riuscire a identificare popolazioni cellulari poco rappresentate. Poiché la sensibilità varia a seconda della tipologia di piattaforma utilizzata e della dimensione dell'anomalia, è importante che ogni laboratorio stabilisca, mediante tecniche di diluizione, la sensibilità del proprio test nell'identificazione del mosaicismo, mediamente rilevabile quando presente almeno nel 20% delle cellule (22).

Essendo numerose le varianti in numero di copie (CNVs) che possono essere identificate quando viene indagata una neoplasia, l'interpretazione del significato delle CNVs può risultare complessa e richiede una conoscenza approfondita delle alterazioni clinicamente rilevanti associate a specifici quadri diagnostici, al fine di riconoscere i riarrangiamenti ricorrenti o potenzialmente significativi che costituiscono marcatori genetici prognostici utili. L'analisi delle CNVs è complicata anche dal fatto che gli "array" rilevano contemporaneamente sia le varianti costituzionali del paziente che le varianti acquisite proprie del tumore: sebbene per discriminare queste ultime sia vantaggioso utilizzare come riferimento il DNA costituzionale normale dello stesso paziente, in pratica, ottenere DNA da tessuti sani risulta di difficile realizzazione per la maggior parte dei laboratori diagnostici.

Per facilitare l'interpretazione di questi campioni complessi sono state recentemente pubblicate delle linee guida che definiscono criteri minimi standardizzati

per la diagnostica e sono disponibili diverse banche dati che raccolgono e classificano le varianti supportando l'operatore nell'analisi (23).

Pur avendo un enorme potenziale, date le problematiche connesse, l'analisi CGH è da considerarsi ancora una tecnica complementare che, al momento, non può sostituire l'analisi citogenetica.

## APPLICAZIONI DELL'ANALISI CITOGENETICA

### Diagnosi

Nel 2001, l'OMS ha aggiunto al "French-American-British (FAB) classification system" delle leucemie una nuova classificazione delle neoplasie ematologiche integrando morfologia, immunofenotipo, genetica e clinica. Nel successivo aggiornamento del 2008 è stato sottolineato come la citogenetica sia uno strumento diagnostico fondamentale e imprescindibile nella classificazione di particolari sottotipi di leucemie e linfomi (24). Insieme alla genetica molecolare, essenziale per l'identificazione di mutazioni non altrimenti diagnosticabili, essa riveste un ruolo cruciale non solo nella diagnosi, ma anche nella prognosi, nella stratificazione dei pazienti e spesso nella scelta del trattamento dei pazienti affetti da patologie mielo e linfoproliferative. Nel nuovo aggiornamento WHO è atteso l'ingresso nella classificazione di molte nuove entità e anomalie, quali per esempio la leucemia mieloide cronica (CML) atipica Ph negativa (25).

Molte anomalie citogenetiche definiscono specifici sottotipi di leucemie. Solo per citare gli esempi più noti: la t(15;17) identifica la leucemia acuta promielocitica (APL) e la sua sola presenza, indipendentemente dai risultati di altri esami ne conferma la diagnosi; il riscontro del cromosoma Ph nella CML indica invece, tra le malattie mieloproliferative croniche, questo unico sottotipo; ancora, la presenza del riarrangiamento *FIP1L1-PDGFR* caratterizza l'ipereosinofilia. Nella leucemia linfoblastica a cellule B (B-ALL), la ploidia definisce entità citogenetiche distinte, da altamente ipodiploidi con 31-39 cromosomi a quasi tetraploidi con 44-100 cromosomi. Inoltre, moltissimi riarrangiamenti ricorrenti, come la t(1;19), la t(9;22), le anomalie di *KMT2A*, la t(12;21), i riarrangiamenti di *IGH* e tanti altri, sono fortemente associati all'andamento della malattia (24).

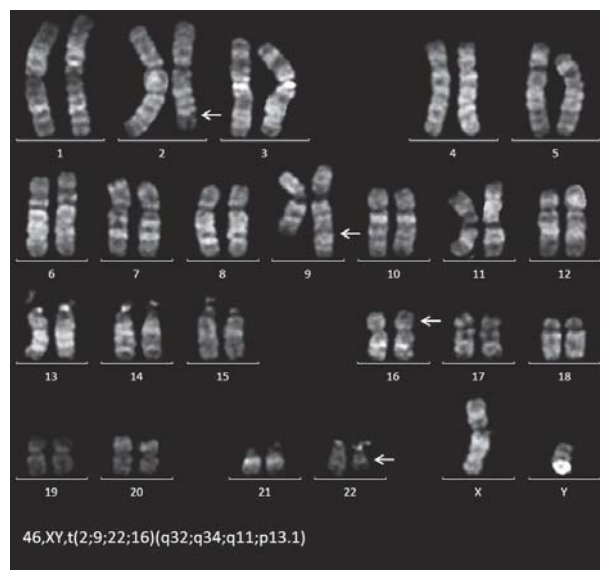
Analogamente, le linee guida dell'"International prognostic scoring system" (IPSS) e il "National comprehensive cancer network" riconoscono 5 categorie prognostiche nelle mielodisplasie (MDS), che includono valutazione dei riarrangiamenti coinvolgenti il 3q, monosomia/delezione 5q e 7q, trisomia 8 e 19, delezione 12p e delezione 20q (26).

Analisi aggiuntive con FISH devono tuttavia essere affiancate all'analisi citogenetica ogni volta che essa non risulta esaustiva: nel caso di sospetta malattia dovuta a un'anomalia submicroscopica (ad es., *FIP1L1-PDGFR*, riarrangiamenti di *KMT2A*), nell'identificazione di cromosomi derivativi o marcatori, nel caso di cariotipi complessi che possono mascherare la presenza di un

riarrangiamento ricorrente tipico di una particolare neoplasia, nei riarrangiamenti varianti, che coinvolgono più cromosomi (Figura 3), o criptici (ad es., apparente assenza del cromosoma Ph, ma presenza del trascritto *Bcr/Abi*) o in assenza di metafasi. La FISH è necessaria nei casi di mieloma multiplo (MM) per ricercare le traslocazioni tipiche della malattia direttamente sui nuclei interfascici delle plasmacellule che, notoriamente, hanno un basso indice mitotico in coltura (27). La FISH diventa il metodo di scelta nei casi in cui anomalie submicroscopiche note sono marcatori diagnostici e prognostici, per esempio nella ricerca della delezione di *TP53* (17p) (sfavorevole) e della delezione di *DLEU* (13q14) (favorevole) nelle leucemie linfatiche croniche (CLL) (28).

**Prognosi**

Le anomalie genetiche che determinano la trasformazione maligna, responsabili delle caratteristiche biologiche del clone neoplastico, correlano con l'andamento della malattia. Nelle leucemie acute mieloidi (AML), secondo l'“European leukemia network” (ELN), il cariotipo è ancora oggi un indicatore prognostico imprescindibile che, insieme allo stato mutazionale di alcuni geni (ad es., *CEBPA*, *NPM1*), definisce 4 classi di rischio sulla base della presenza di specifiche anomalie citogenetiche (Tabella 1) (29, 30). Le anomalie ricorrenti



**Figura 3**  
Leucemia mieloide cronica con traslocazione variante diretta in cui sono coinvolti 4 cromosomi (2, 9, 22, 16). La regione 2q32-2qter è traslocata in 9q34; la regione 9q34-9qter è traslocata in 22q11 con formazione del cromosoma Ph; la regione 22q11-22qter è traslocata in 16p13.1; la regione 16p13,1-16pter è traslocata in 2q32. Le frecce sul cariotipo indicano i punti di rottura.

**Tabella 1**

Correlazione dei dati citogenetici e molecolari con la classificazione prognostica nella leucemia mieloide acuta (AML). La tabella riporta la stratificazione in gruppi di rischio secondo le raccomandazioni dell'“European leukemia network” per la diagnosi e il trattamento dell'AML (30)

Rischio genetico	Cariotipo	Gene di fusione
Favorevole	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)	<i>CBFB-MYH11</i>
	Cariotipo normale con: mutazioni in <i>NPM1</i> senza <i>FLT3-ITD</i> mutazioni in <i>CEBPA</i>	
Intermedio-I	Cariotipo normale	
	Cariotipo normale con: mutazioni in <i>NPM1</i> e <i>FLT3-ITD</i> assenza di mutazioni in <i>NPM1</i> e <i>FLT3-ITD</i> assenza di mutazioni in <i>NPM1</i> senza <i>FLT3-ITD</i>	
	Intermedio-II	t(9;11)(p22;q23)
Sfavorevole	Anomalie citogenetiche non classificate come favorevoli o avverse	
	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2)	<i>RPN1-EV11</i>
	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23)	Riarrangiamenti di <i>MLL</i>
	-5 o del5q, -7; anomalie 17p	
	Cariotipo complesso (3 o più anomalie in assenza di riarrangiamenti ricorrenti definiti dall'OMS)	

sono riconosciute come un fattore prognostico indipendente e sono correlate con la risposta alla terapia, la ricaduta e la percentuale di sopravvivenza. I pazienti con t(8;21), t(15;17) e inv(16) rientrano in una categoria a basso rischio con prognosi favorevole, mentre i pazienti con monosomia/delezione del 5 o del 7, inv(3)/t(3;3) e t(6;9) rientrano nella categoria a elevato rischio con prognosi sfavorevole (31).

Altre aberrazioni assumono un significato diverso a seconda del tumore in cui si osservano: per esempio la delezione del 5q, sfavorevole nell'AML, assume un significato prognostico favorevole nelle MDS (30, 32). La non specificità delle anomalie è frequente e può essere dovuta alla diversità dell'alterazione a livello molecolare, alla coesistenza di altre alterazioni o all'influenza di altre caratteristiche biologiche del tumore che impattano sulla prognosi. È noto, infatti, che il significato prognostico nello stesso tipo di tumore può variare se l'anomalia riscontrata si presenta isolata o con anomalie aggiuntive.

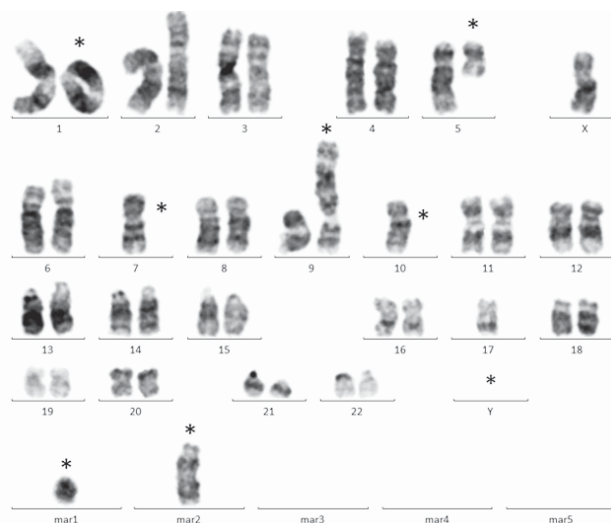
Esistono poi anomalie, quali per esempio la delezione di TP53, identificabile con la FISH, che hanno un impatto negativo sia che vengano identificate in una CLL che nell'AML o CML. Infine, la presenza di cariotipo complesso in qualsiasi disordine ematologico determina prognosi sfavorevole (Figura 4) (29).

## Terapia

Nella maggior parte delle neoplasie ematologiche le anomalie citogenetiche influenzano la scelta della terapia. Se nelle classi di leucemia a basso rischio viene utilizzato un trattamento standard, la presenza di anomalie a significato avverso comporta regimi di trattamento più aggressivi. A volte, all'identificazione di una determinata anomalia, segue uno specifico trattamento, come nel caso della t(15;17) nell'APL, nella quale la terapia di scelta è l'acido trans-retinoico (ATRA). Questo è in grado di indurre cambiamenti conformazionali della proteina di fusione PML/RARA, responsabile del blocco della differenziazione della linea mieloide allo stadio di promielocita, permettendo il completamento del programma di differenziamento granulocitario. L'introduzione di ATRA nei regimi terapeutici ha radicalmente modificato la prognosi della malattia con ottenimento di un'altissima percentuale di remissioni complete e sopravvivenza libera da malattia (33).

I miglioramenti nell'efficacia dei trattamenti hanno avuto in molti casi considerevoli effetti sull'aspettativa di vita a lungo termine. Nelle ALL pediatriche, ad esempio, trattamenti terapeutici intensivi sono in grado di superare gli effetti prognostici avversi di molte anomalie associate, quali la t(1;19) e la t(4;11) modificando addirittura il "timing" al quale un paziente può essere considerato guarito (34).

Il riscontro di specifiche anomalie note decreta a volte la scelta di un programma di trapianto di midollo osseo, come nei casi di AML in cui è presente un riarrangiamento coinvolgente il locus *EVI1-MDS1* (MECOM) sul braccio lungo del cromosoma 3 (30).



45,X,-Y,ring(1),del(5q),-7,der(9)t(3;9),-10,-17,+mar1,+mar2

### Figura 4

*Cariotipo complesso in un caso di mielodisplasia in evoluzione leucemica. Il cariotipo evidenzia la presenza di un derivativo ad anello del cromosoma 1, la delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 5, la monosomia dei cromosomi 7, 10, 17, un derivativo di un cromosoma 9 da traslocazione tra un cromosoma 3 e un cromosoma 9, due cromosomi marcatori e l'assenza del cromosoma Y.*

Nell'ultimo decennio, l'identificazione delle basi genetiche di molte malattie oncoematologiche e il conseguente sviluppo di terapie molecolari mirate hanno cambiato drammaticamente il trattamento clinico dei pazienti. La terapia con imatinib nella CML Ph+ rappresenta il primo esempio di cura da parte di una classe di agenti che inibiscono l'attività di una specifica tirosinchinasi nelle cellule tumorali. L'imatinib, attraverso un legame specifico con la proteina tradotta dal gene chimerico *BCR/ABL*, conduce ad apoptosi le sole cellule leucemiche che contengono l'anomalia genetica ed è caratterizzato da scarsi effetti collaterali. Se in epoca pre-imatinib la sopravvivenza media di un paziente affetto da CML era di 3 anni, oggi grazie a questa terapia la sopravvivenza a 10 anni è >90% (35, 36). A questa terapia rivoluzionaria, che ha cambiato radicalmente la prognosi nella CML, si sono aggiunti via via farmaci di seconda generazione e nuove molecole dirette verso altri geni di fusione, che già sono entrati nella pratica clinica o che si sono rivelati molto promettenti in altre patologie tumorali.

## CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni grazie ai progressi tecnologici innovativi, la possibilità di identificare anomalie cromosomiche nelle neoplasie ematologiche è andata aumentando e le informazioni ottenute sono rapidamente entrate nella pratica clinica. L'analisi citogenetica convenzionale fornisce le informazioni che

permettono la stratificazione dei pazienti in differenti gruppi di rischio e la scelta della terapia più efficiente. Combinata all'analisi del cariotipo, la FISH si è dimostrata cruciale nel ricercare o confermare specifiche anomalie o presenza di fusioni geniche, anche in assenza di metafasi. Con l'avvento delle tecniche molecolari derivate dalla FISH, quali la M-FISH, e dei "CGH-array", si sono aggiunti strumenti che possono essere di grande aiuto all'identificazione di sbilanciamenti e alla definizione di anomalie complesse.

È importante, in questo contesto, accennare alle tecnologie che negli ultimi anni hanno permesso di ampliare in modo così importante l'identificazione di geni e riarrangiamenti cancro correlati. Con l'introduzione del sequenziamento di nuova generazione (NGS), ad esempio, il panorama dei trascritti chimerici coinvolti nel cancro è cambiato in modo sorprendente: migliaia di geni coinvolti in fusioni sono stati identificati, rendendo estremamente entusiasmanti le possibilità intrinseche di queste scoperte (37, 38). Ad oggi, tuttavia, l'impatto che molte di queste informazioni hanno sulla comprensione della carcinogenesi e sulla clinica è ancora da valutare e un gran numero di domande attende ancora risposte.

L'obiettivo di un laboratorio di citogenetica è di identificare le strategie diagnostiche più utili e significative, a seconda del quesito cui si deve rispondere e a seconda della fase di malattia (esordio, monitoraggio, recidiva), per fornire al clinico le informazioni rilevanti per il trattamento del paziente. Tali informazioni, insieme ai dati di biologia molecolare, sono parte integrante e imprescindibile nella diagnosi, prognosi e terapia delle malattie oncematologiche.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
- Lawler SD. Chromosomes in haematology. *Br J Haemat* 1969;17:139-43.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970;60:315-9.
- Zech L, Haglund U, Nilsson K, et al. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976;17:47-56.
- Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 1973;16:109-12.
- Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1977;1:549-50.
- Zech L, Gahrton C, Killander D, et al. Specific chromosomal aberrations in polycythemia vera. *Blood* 1976;48:687-96.
- Van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, et al. The 5q-anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;17:189-255.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007;7:233-45.
- Polack JM, O'D McGee J, eds. *In situ hybridization principle and practice*. Oxford: Oxford Science Publication, 1990.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. National Cancer Institute. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Hastings R, Howell R, Betts D, et al. Guidelines and quality assurance for acquired cytogenetics. [www.e-ca.eu/files/downloads/Guidelines/NL31\\_Acquired\\_Guidelines](http://www.e-ca.eu/files/downloads/Guidelines/NL31_Acquired_Guidelines)
- Verma RS, Babu A. *Human chromosomes: Manual of basic techniques*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1995.
- Heim S, Mitelman F, eds. *Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*, 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2015.
- Wilkinson DG, ed. *In situ hybridization: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* 1996;12:368-75.
- Shao L, Kang SH, Li J, et al. Array comparative genomic hybridization detects chromosomal abnormalities in hematological cancers that are not detected by conventional cytogenetics. *J Mol Diagn* 2010;12:670-9.
- Dougherty MJ, Wilmoth DM, Tooke LS, et al. Implementation of high resolution single nucleotide polymorphism array analysis as a clinical test for patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet* 2011;204:26-38.
- Kolquist KA, Schultz RA, Furrow A, et al. Microarray-based comparative genomic hybridization of cancer targets reveals novel, recurrent genetic aberrations in the myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet* 2011;204:603-28.
- Gibson SE, Luo J, Sathanoori M, et al. Whole-genome single nucleotide polymorphism array analysis is complementary to classical cytogenetic analysis in the evaluation of lymphoid proliferations. *Am J Clin Pathol* 2014;141:247-55.
- Cooley LD, Lebo M, Li MM, et al. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: Microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders. *Genet Med* 2013;15:484-94.
- Schoumans J, Suela J, Hastings R, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Gene Chromosomes Cancer* 2016;55:480-91.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4<sup>th</sup> ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;12:2454-65.
- Schmidt-Hieber M, Gutiérrez ML, Pérez-Andrés M, et al.

- Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica* 2013;98:279-87.
28. Foà R, Del Giudice I, Guarini A, et al. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98:675-85.
  29. European Leukemia Net (ELN). [www.leukemia-net.org/](http://www.leukemia-net.org/)
  30. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-74.
  31. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2014;28:1586-95.
  32. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2014;89:97-108.
  33. De Thé H, Chomienne C, Lanotte M, et al. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990;347:558-61.
  34. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551-65.
  35. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008;112:4808-17.
  36. Kantarjian HM, Larson RA, Cortés JE, et al. Current practices in the management of chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13:48-54.
  37. Welch JS, Westervelt P, Ding L, et al. Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 2011;305:1577-84.
  38. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:371-81.

## Indagine conoscitiva su matrice biologica e gestione della fase preanalitica nei laboratori clinici

Giuseppe Lippi<sup>1</sup>, Davide Giavarina<sup>2</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio

<sup>1</sup>Sezione di Chimica Clinica, Università di Verona, Verona

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi, Ospedale S. Bortolo, Vicenza

### ABSTRACT

**A survey on sample matrix and preanalytical management in clinical laboratories.** The vast majority of biochemistry tests is traditionally performed using either serum or heparinized plasma. Since little information is available on organization of clinical chemistry areas and type of biological samples used for this type of testing, the SIBioC Study Group on Extra-analytical variability planned a survey to be delivered to the members of the society. The questionnaire, consisting of 10 questions, was delivered by two newsletters and published on the SIBioC website for one month. Overall, 229 replies were collected from ~3000 society members. The most relevant aspect emerged from the survey was that serum not only was the most common biological matrix used for clinical chemistry tests (82% of responders), but it was also regarded as the ideal biological matrix (76% of responders). In 80% of cases, clinical chemistry testing was performed using blood collected in tubes containing a separator. Unlike ordinary testing, urgent analyses were performed using serum only in 58% of cases. The use of blood tubes with separator was also more frequent for urgent chemistry testing (64% of responders). A physical integration between clinical chemistry instruments was reported in approximately half of cases, whereas integration with preanalytical modules was reported to be slightly lower (45% of responders). The availability to change the biological matrix by the majority of responders demonstrates a substantial awareness that a major degree of harmonization should be pursued in the preanalytical phase.

### INTRODUZIONE

Un requisito irrinunciabile per l'esecuzione di esami di laboratorio è la disponibilità di un campione biologico (1). Ciò presuppone inevitabilmente l'utilizzo di provette per la raccolta del sangue, atte a rendere il campione idoneo per l'analisi (2). Tradizionalmente, i campioni destinati agli esami di laboratorio sono raccolti in provette prive di additivi o contenenti attivatori della coagulazione (da cui ottenere siero) o contenenti anticoagulanti di varia natura e con diversa funzione. I sali di EDTA, citrato e ossalato, non sono utilizzati per gli esami di chimica clinica, poiché questi anticoagulanti fungono da chelanti del calcio e contengono altresì nella loro formulazione chimica degli ioni che sono comunemente misurati in laboratorio (potassio, fosforo, sodio) (3). Per quanto concerne il plasma, la litio-eparina è l'anticoagulante comunemente utilizzato, preferibile alla sodio-eparina al fine di prevenire problematiche relative alla determinazione del sodio.

In generale, per eseguire la maggior parte degli esami di chimica clinica è possibile utilizzare siero o plasma eparinato, matrici che generano risultati sufficientemente equivalenti, fatta eccezione per alcuni analiti [potassio e lattato deidrogenasi (LDH)] (3). La scelta dell'una o dell'altra matrice è lasciata quindi alla discrezione del laboratorio, previa valutazione dei vantaggi e degli svantaggi (Tabella 1).

L'utilizzo del plasma per gli esami di chimica clinica consente ai laboratori di analizzare i campioni più rapidamente, evitando di attendere 15-60 min (a seconda del tipo di additivo utilizzato) per la coagulazione del campione, come comunemente indicato per i campioni di siero. Il vantaggio è indubbiamente riferibile a una riduzione del "turnaround" time (TAT), soprattutto per esami in regime di urgenza. Ulteriori vantaggi del plasma rispetto al siero comprendono la presenza del fibrinogeno e dei fattori della coagulazione altresì assenti nel siero (è quindi un campione più rappresentativo della situazione

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Section of Clinical Biochemistry, University Hospital of Verona. P.le LA Scuro 10, 37134 Verona. Tel. 0458124308, Fax 0458124308, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 01.06.2016

Revisionato: 04.08.2016

Accettato: 06.09.2016

Pubblicato on-line: 08.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.018

**Tabella 1**

*Vantaggi relativi all'impiego del plasma eparinato e del siero per l'esecuzione dei dosaggi di laboratorio*

*Vantaggi del plasma eparinato*

- Campione più rappresentativo della situazione *in vivo* per presenza dei fattori della coagulazione
- Riduzione del "turnaround time", soprattutto per esami in urgenza
- Minor rischio di malposizionamento del gel (o altro materiale) separatore
- Eliminazione di interferenza da fibrina
- Maggior "resa" del campione

*Vantaggi del siero*

- Assenza totale di elementi cellulari dopo centrifugazione
- Maggior stabilità del campione in assenza di gel separatore
- Assenza di anticoagulante
- Possibilità di utilizzare il campione per l'elettroforesi sieroproteica
- Minor rischio di attivazione da caldo e/o freddo dei fattori della coagulazione
- Numero più ampio di metodi validati su questa matrice

*in vivo*), il minor rischio di malposizionamento del gel (o altro materiale) separatore e l'eliminazione di interferenza da fibrina, circostanza episodicamente descritta in relazione ad alcuni immunodosaggi (4-7). Quest'ultimo fenomeno è particolarmente accentuato in campioni raccolti da pazienti in terapia anticoagulante, poiché l'anticoagulante rallenta la formazione della fibrina. Infine, la resa del campione (intesa come la quantità di plasma ottenibile dopo centrifugazione) è tradizionalmente maggiore per il plasma eparinato rispetto al siero. Rimane oggetto di controversia il fatto che il plasma possa ridurre la percentuale di campioni emolizzati rispetto al siero. Ad esempio, la concentrazione di emoglobina libera misurata in un campione di popolazione non selezionato è apparsa più elevata nel siero rispetto al plasma (8). Tuttavia, durante il trasporto con posta pneumatica, il siero sembra essere meno vulnerabile all'emolisi rispetto al plasma (9).

Tuttavia, anche l'utilizzo del siero presenta alcuni innegabili vantaggi rispetto al plasma, rappresentati essenzialmente dal fatto che il siero è virtualmente privo di elementi cellulari dopo centrifugazione, mentre nel plasma residua un numero non indifferente di leucociti, eritrociti, piastrine e detriti cellulari aspecifici (10). L'utilizzo di siero (soprattutto utilizzando provette prive di attivatori della coagulazione) non comporta poi l'aggiunta al sangue di alcun tipo di anticoagulante, rappresentando pertanto una matrice meno alterata rispetto al plasma e riducendo contestualmente la possibile interferenza dell'anticoagulante stesso. Altri vantaggi documentati sono riferibili alla rimozione del fibrinogeno durante il processo di coagulazione del siero che consente l'utilizzo del campione per l'elettroforesi sieroproteica e il minor rischio di attivazione da caldo e/o freddo dei fattori della coagulazione presenti nel plasma eparinato con conseguente formazione di gel di fibrina nel campione separato (da cui si deduce una maggiore stabilità del campione durante il processo di conservazione a medio-

lungo termine) (11). In assenza di un separatore fisico (ad es., gel), che si interponga tra il "pellet" cellulare e la matrice sovrastante, l'eventuale inversione/agitazione delle provette determina ovviamente una parziale risospensione degli elementi corpuscolati, evento molto meno probabile utilizzando provette di siero (gli elementi cellulari rimangono stabilmente intrappolati nel coagulo) (10).

Poiché non sembrano a oggi esistere informazioni attendibili in merito alla tipologia di matrice biologica utilizzata dai laboratori clinici per gli esami di chimica clinica, il Gruppo di Studio (GdS) SIBioC sulla Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio ha pianificato un sondaggio da somministrare ai soci al fine di ottenere informazioni più accurate in merito alla matrice biologica in uso e alla gestione della fase preanalitica degli esami di chimica clinica nei laboratori nazionali.

## MATERIALI E METODI

Il GdS ha sviluppato un questionario comprendente 10 quesiti (Tabella 2). Il questionario è stato quindi adattato alla piattaforma SurveyMonkey. Informazioni in merito al questionario sono state trasmesse mediante due "newsletter" della società e ampia diffusione è stata data sul sito web della stessa. Il questionario è rimasto disponibile per la compilazione per un mese (aprile-maggio 2016). La differenza statistica tra la percentuale di risposte è stata analizzata mediante test del chi quadro.

## RISULTATI

Al termine del periodo di apertura del sondaggio sono state registrate 229 risposte a fronte di oltre 3000 soci iscritti alla SIBioC. Il 65% dei professionisti che hanno risposto ha indicato di lavorare in laboratori pubblici, mentre il 35% ha dichiarato di lavorare in laboratori

**Tabella 2***Quesiti relativi all'indagine conoscitiva sulla fase preanalitica degli esami di chimica clinica*

1. La struttura in cui lavori è:
  - laboratorio privato
  - laboratorio pubblico
  - altro (specificare)
2. Il numero di esami di chimica clinica per anno nel tuo laboratorio è:
  - <10.000
  - 10.000-100.000
  - 100.000-500.000
  - >500.000
3. La collocazione del tuo laboratorio in Italia è:
  - Nord
  - Centro
  - Sud e Isole
4. Quale ritieni sia la matrice ideale per l'effettuazione degli esami di chimica clinica?
  - Siero
  - Plasma (litio-eparina)
  - Altro (specificare)
5. Quale provetta usi nel tuo laboratorio per l'effettuazione degli esami di chimica clinica in regime ordinario?
  - Siero con gel separatore
  - Siero senza gel separatore
  - Plasma con gel separatore
  - Plasma senza gel separatore
  - Altro (specificare)
6. Quale provetta usi nel tuo laboratorio per gli esami di chimica clinica in regime in urgenza?
  - Siero con gel separatore
  - Siero senza gel separatore
  - Plasma con gel separatore
  - Plasma senza gel separatore
  - Altro (specificare)
7. Gli strumenti di chimica clinica nel tuo laboratorio sono collegati in catena?
  - Sì
  - No
  - Parzialmente
8. Gli strumenti di chimica clinica nel tuo laboratorio sono collegati a una automazione per la fase preanalitica (ad es., stappatura, aliquotazione, centrifugazione)?
  - Sì
  - No
  - Parzialmente
9. Pensi di cambiare il tipo di matrice per gli esami di chimica clinica nei prossimi 3 anni?
  - Sì
  - No
  - Non so
10. Saresti disposto a cambiare matrice per gli esami di chimica clinica nell'ambito di un progetto di armonizzazione tra laboratori limitrofi (regione, area geografica)?
  - Sì
  - No
  - Non so

privati convenzionati e/o strutture private accreditate.

In relazione alla dimensione delle strutture, il 46,3% dichiarava un volume di esami >500.000 per anno, il 31,9% un volume di esami compreso tra 100.000-500.000 per anno, il 16,6% un volume di esami compreso tra 10.000-100.000 per anno e il rimanente 5,2% un volume di esami <10.000 per anno.

La maggior parte delle risposte ai quesiti è provenuta da laboratori del Nord Italia (49,3%), seguiti da quelli del Centro Italia (31,0%) e del Sud o Isole (19,7%).

La maggior parte dei professionisti che hanno risposto al questionario (76%) ha indicato il siero quale matrice ideale per l'esecuzione degli esami di chimica clinica, mentre il 23% ritiene che il plasma lio-eparina sia la matrice ideale. 1% riteneva ideali entrambi. Non si è osservata una differenza significativa nella distribuzione delle risposte in funzione del volume di esami eseguiti dai laboratori ( $P=0,36$ ).

La maggior parte dei professionisti che hanno risposto (70%) ha dichiarato di usare provette di siero con gel separatore per gli esami di chimica clinica in regime ordinario. Al secondo posto tra le risposte si è collocata la provetta di siero senza gel separatore (12%), seguita da provetta di plasma con gel separatore (10%) e plasma senza gel separatore (8%). Si è osservata una differenza significativa nella distribuzione delle risposte in funzione del volume di esami dei laboratori ( $P=0,001$ ), attribuibile sostanzialmente al minor utilizzo di provette di siero con gel separatore in laboratori con volume di esami <10.000 per anno (50% contro una media generale del 71% nei laboratori con volume di esami >10.000 per anno).

Malgrado la maggior parte dei professionisti che hanno risposto (49%) abbia dichiarato di usare provette di siero con gel separatore anche per gli esami di chimica clinica in regime di urgenza, la differenza tra le varie tipologie di provette era meno marcata. In sostanza, 27% ha dichiarato di usare provette di plasma senza gel separatore, seguite da provetta di plasma con gel separatore (15%) e siero senza gel separatore (9%). Non si è però osservata alcuna differenza significativa nella distribuzione delle risposte in funzione del volume di esami ( $P=0,11$ ).

La risposta allo specifico quesito ha dimostrato una sostanziale equivalenza in merito all'organizzazione degli strumenti di chimica clinica. Infatti, i professionisti che hanno risposto ha dichiarato che gli strumenti di chimica clinica non sono collegati in catena nei loro laboratori nel 45% dei casi, una percentuale praticamente sovrapponibile a quella di coloro che hanno dichiarato che gli strumenti di chimica clinica sono collegati in catena (44%). 11% di coloro che hanno risposto dichiara di avere collegamenti parziali degli analizzatori. Trascurando il numero esiguo di risposte in laboratori con numero di esami <10.000/anno, si è osservata una relazione inversa tra volume di esami e assenza/presenza di una catena di collegamento tra gli strumenti di chimica clinica (66% in laboratori con 10.000-100.000 esami/anno, 62% in laboratori con 100.000-500.000 esami/anno e solo 25% in laboratori

con >500.000 esami/anno;  $P < 0,001$ ).

La maggior parte dei professionisti che hanno risposto (56%) ha dichiarato l'assenza di una connessione fisica tra gli strumenti di chimica clinica e automazione della fase preanalitica. Di converso, 36% ha dichiarato che gli strumenti di chimica clinica sono collegati all'automazione della fase preanalitica, mentre il rimanente 8% ha dichiarato che in laboratorio esiste un collegamento almeno parziale. Anche in questo caso, la distribuzione delle risposte non è stata omogenea; 61% dei laboratori con <500.000 esami per anno ha dichiarato l'esistenza del collegamento automazione-chimica clinica, contro appena 12% degli altri laboratori ( $P < 0,001$ ).

La maggior parte dei professionisti che hanno risposto (56%) ha espresso la volontà di non cambiare il tipo di matrice per gli esami di chimica clinica nei prossimi 3 anni, mentre 36% si è dichiarato possibilista. Non si è evidenziata alcuna differenza tra le risposte in relazione al volume annuo di esami ( $P=0,75$ ).

La risposta al quesito finale è stata molto interessante, perché in parziale disaccordo con la precedente. In sintesi, la maggior parte dei professionisti (63%) ha dichiarato che sarebbe disponibile a modificare la matrice biologica in uso se ciò rientrasse in un progetto di riorganizzazione locale della diagnostica di laboratorio. 30% di coloro che hanno risposto si è dichiarato possibilista a valutare questa ipotesi, mentre solo il 7% non si renderebbe disponibile. Analogamente al caso precedente, non si è evidenziata alcuna differenza tra le risposte in relazione al volume annuo di esami ( $P=0,75$ ).

## DISCUSSIONE

I risultati del questionario sulla matrice biologica e la gestione preanalitica degli esami di chimica clinica rappresentano un'utile informazione per definire con relativa approssimazione lo stato dell'arte in Italia. Indubbiamente, il numero limitato di risposte ricevute in relazione al numero totale degli iscritti alla società (poco meno del 8%) non consente una generalizzazione delle conclusioni ma, quanto meno, offre utili spunti di riflessione.

L'aspetto più rilevante che emerge dalle risposte al questionario è che il siero rappresenta non solo la matrice biologica più utilizzata per gli esami di chimica clinica in regime ordinario, ma anche quella considerata "ideale" dalla maggior parte dei laboratori. Interessante il rilievo che nel 80% dei casi le provette utilizzate siano dotate di separatore. La situazione è invece molto diversa per quanto attiene gli esami eseguiti in urgenza, caratterizzati ovviamente da un TAT molto più restrittivo. In questa circostanza, si evidenzia un quadro più omogeneo tra le due matrici biologiche (58% siero, 42% plasma eparinato).

L'uso di matrici diverse (siero e plasma) per gli stessi esami, a seconda che essi siano richiesti in regime ordinario o urgente, è motivo di discussione. In generale, gran parte degli esami di chimica clinica sono compatibili

con l'uso di siero o di plasma e i risultati sono sostanzialmente equivalenti, al punto che è possibile utilizzare gli stessi intervalli di riferimento. Tuttavia, per certi metodi il plasma può non essere accettabile oppure alcune differenze significative devono essere considerate. Ad esempio, potassio e fosfato aumentano nel siero a causa del rilascio da leucociti e piastrine durante il processo coagulativo (3, 12, 13). Una pseudoiperpotassiemia è stata associata alle condizioni di trombocitemia essenziale o di trombocitosi se la determinazione è eseguita su siero, facendo ipotizzare che sia preferibile misurare il potassio nel plasma, specie in presenza di una concentrazione elevata di piastrine (14-16). Di contro, la concentrazione delle proteine nel plasma può essere moderatamente più alta per la presenza del fibrinogeno e si possono anche osservare differenze per certi enzimi, come LDH e aspartato aminotransferasi (12, 13). L'eparina può infine interferire con alcuni immunodosaggi, anche se per molti analiti è stata dimostrata l'equivalenza di matrice (17). Per queste motivazioni l'uso di matrici diverse tra ordinario e urgenza può essere fonte di differenze significative nei risultati, soprattutto nella valutazione longitudinale dei risultati dello stesso paziente.

Ritornando ai risultati del questionario, l'utilizzo del separatore è meno frequente per gli esami in urgenza rispetto a quelli in ordinario. Interessante anche il rilievo che, malgrado il 56% dei rispondenti non stia considerando l'ipotesi di modificare la matrice biologica, complessivamente il 93% si dichiarerebbe disponibile a valutare questa possibilità nell'ambito di un progetto di armonizzazione con laboratori limitrofi. Nelle circostanze valutate da questi due quesiti, la dimensione del laboratorio (espressa in termini di numero di esami per anno) non è apparsa un elemento discriminante.

Due quesiti specifici del questionario hanno riguardato l'organizzazione dell'area per esami di chimica clinica nei laboratori. Il dato complessivo indica che gli strumenti di chimica clinica sono integrati tra loro solo nella metà dei casi (56%), mentre l'integrazione con moduli di preanalitica è globalmente inferiore (45%). In entrambi i casi, l'organizzazione dei laboratori è apparsa sostanzialmente disomogenea in relazione alle dimensioni del laboratorio, con diversi gradi di integrazione presenti molto più frequentemente nei laboratori di maggiori dimensioni. Malgrado il quesito numero 7 comprenda anche un aspetto organizzativo della fase analitica del processo, le moderne catene di automazione di quasi tutti i produttori contemplano soluzioni modulari che includono stazioni di "check-in", "sorting", centrifugazione, stappatura delle provette, aliquotazione, controllo di qualità (ad es., indici del siero, verifica del volume, presenza di coaguli), ritappatura e stoccaggio. È sembrato quindi pertinente aggiungere anche questo quesito al questionario.

Il confronto con un analogo questionario somministrato ai soci SIBioC nel 2006, con meno della metà delle risposte rispetto a quello del 2016 (18), offre l'opportunità di valutare l'evoluzione delle opinioni e delle

attività nei laboratori clinici italiani. Nel censimento di 10 anni fa, il grado di automazione dell'area di chimica clinica era apparso molto inferiore rispetto a oggi (31% vs. 56%). L'utilizzo del siero per esami ordinari è moderatamente aumentato (da 74% a 82%), così come è moderatamente accresciuto l'utilizzo delle provette con separatore (da 70% a 80%).

In conclusione, l'uso del siero come campione biologico pare essere predominante e addirittura in aumento nelle diverse regioni italiane. I laboratoristi che hanno risposto a questa indagine, analogamente alla precedente, ritengono che il siero sia la matrice preferibile, probabilmente perché molti processi e tecniche di laboratorio sono standardizzati su di esso. Quando si considerano gli esami in urgenza, la percentuale di utilizzo del plasma aumenta, confermando che il maggior vantaggio percepito per l'uso del plasma è la riduzione del TAT. Tuttavia, ciò solleva alcuni dubbi, poiché non tutte le determinazioni sono equivalenti usando le due matrici. Sarebbe quindi auspicabile la standardizzazione su un unico tipo di matrice, almeno all'interno dello stesso laboratorio. In chimica clinica, siero e plasma offrono entrambi benefici e svantaggi. Nella crescente necessità di armonizzazione tra i diversi laboratori che insistono su analoghe aree geografiche (19), l'armonizzazione delle matrici dei campioni da analizzare rappresenta un obiettivo importante, che può avere significative ricadute cliniche. La disponibilità al cambiamento, dichiarata dai partecipanti all'indagine, nonostante una robusta convinzione sulla matrice da preferire, dimostra la crescente sensibilità ai problemi di armonizzazione e la disponibilità a una discussione su questo particolare ma non irrilevante aspetto preanalitico.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Caputo M, Banfi G, et al. Raccomandazioni per il prelievo di sangue venoso. *Biochim Clin* 2008;32:569-77.
2. Giavarina D, Banfi G, Daves M, et al. Verifica locale dei sistemi di prelievo nei laboratori clinici: adattamento delle linee guida EFLM. *Biochim Clin* 2016;40:347-52.
3. Miles RR, Roberts RF, Putnam AR, et al. Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. *Clin Chem* 2004;50:1704-5.
4. Daves M, Lippi G, Cosio G, et al. An unusual case of a primary blood collection tube with floating separator gel. *J Clin Lab Anal* 2012;26:246-7.
5. Cervellin G, Aloe R, Lippi G. A case of factitious hyponatremia and hypokalemia due to the presence of fibrin gel in serum. *Diagnosis* 2015;2:73-4.
6. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004;25:105-20.
7. Kazmierczak SC, Sekhon H, Richards C. False-positive troponin I measured with the Abbott AxSYM attributed to fibrin interference. *Int J Cardiol* 2005;101:27-31.
8. Lippi G, Giavarina D, Gelati M, et al. Reference range of hemolysis index in serum and lithium heparin plasma

- measured with two analytical platforms in a population of unselected outpatients. *Clin Chim Acta* 2014;429:143-6.
9. Pasqualetti S, Szóke D, Panteghini M. Heparinate but not serum tubes are susceptible to hemolysis by pneumatic tube transportation. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:785-9.
  10. Lippi G, Salvagno GL, Danese E, et al. Inversion of lithium heparin gel tubes after centrifugation is a significant source of bias in clinical chemistry testing. *Clin Chim Acta* 2014;436:183-7.
  11. Boyanton Jr, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem* 2002;48:2242.
  12. Harr R, Bond L, Trumbull D. A comparison of results for serum versus heparinized plasma for 30 common analytes. *Lab Med* 1987;18:449-55.
  13. Ciuti R, Rinaldi G. Serum and plasma compared for use in 19 common chemical tests performed in the Hitachi 737 analyzer. *Clin Chem* 1989;35:1562-3.
  14. Hartland AJ, Neary RH. Serum potassium is unreliable as an estimate of in vivo plasma potassium. *Clin Chem* 1999;45:1091-2.
  15. Howard MR, Ashwell S, Bond LR, et al. Artefactual serum hyperkalaemia and hypercalcaemia in essential thrombocythaemia. *J Clin Pathol* 2000;53:105-9.
  16. Lippi G, Salvagno GL, Guidi GC. Adjustment of serum potassium for age and platelet count. A simple step forward towards personalized medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:e325-7.
  17. Giavarina D, Fortunato A, Barzon E, et al. Evaluation of BD Vacutainer PST II tubes for a wide range of immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:237-41.
  18. Lippi G, Montagnana M, Giavarina D. National survey on the pre-analytical variability in a representative cohort of Italian laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1491-4.
  19. Lippi G, Simundic AM. Laboratory networking and sample quality: a still relevant issue for patient safety. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1703-5.

## Accuratezza dell'immunonefelometria come metodo di screening per la determinazione della proteinuria di Bence Jones

Patrizia Natali, Giovanna Patelli, Simonetta Tagliavini, Daniela Carra, Maria Rosaria Cucinelli, Manuela Varani, Tommaso Trenti

Dipartimento Integrato Interaziendale di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda USL e Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena

### ABSTRACT

**Accuracy of immunonephelometry as a screening method for Bence Jones proteinuria.** The Bence Jones protein (BJP) is an important biomarker for the identification and management of patients with plasma cell dyscrasia. The recommended method for BJP detection is the immunofixation, which is a time consuming and expensive procedure. The aim of the study was to evaluate immunonephelometry (INA) as a screening method for the identification of urine samples negative for BJP and to compare it to a simplified immunofixation method (uIFE-3). First morning urine samples were collected from 1000 consecutive patients and analyzed by INA. Samples with free light chain concentrations  $>10$  mg/L and  $>5$  mg/L were considered positive. All samples were further analyzed by uIFE-3 using 3 antisera (anti-GAM,  $-\kappa$  and  $-\lambda$ ). The INA results (at both cut-off levels) were compared with the uIFE-3, showing a poor accuracy due to the high number of false positives and false negatives. Consequently, INA resulted unable to accurately screen BJP.

### INTRODUZIONE

Il dosaggio della proteina di Bence Jones (PBJ) riveste un importante ruolo nell'inquadramento dei pazienti con discrasia plasmacellulare (PDC). Numerosi studi hanno dimostrato che la massima sensibilità diagnostica (99-100%) per la definizione di una PDC si ottiene combinando la misura delle catene leggere libere (FLC) nel siero, l'immunofissazione sierica e la determinazione di PBJ; quest'ultima risulta poi fondamentale per identificare la proteina monoclonale nei pazienti con amiloidosi AL e con malattia da deposizione di catene leggere (LCDD), dove spesso la componente monoclonale (CM) sierica è molto piccola e/o difficilmente rilevabile, mentre può essere presente e misurabile nelle urine. Le raccomandazioni dell'"International Myeloma Working Group" indicano che la ricerca della PBJ e la sua quantificazione nelle urine delle 24 ore sono essenziali per l'inquadramento clinico del paziente e per la valutazione della risposta alla terapia (1-12).

Nel sottolineare la rilevanza dell'identificazione della PBJ nelle urine di pazienti con PDC, è utile ricordare che

due sono gli elementi fondamentali da considerare quando si ricerchi la PBJ: il primo è accertarsi della monoclonalità delle FLC, il secondo è escludere la presenza di catene pesanti (13, 14).

Il metodo attualmente raccomandato che risponde ai requisiti richiesti per la diagnosi di laboratorio della PBJ è l'immunofissazione delle urine su gel di agarosio (uIFE) con antisieri anti-catene pesanti, anti-catene leggere totali, anti-FLC, in diversa combinazione tra loro (6, 13-15). Il limite di tale metodica è tuttavia quello di richiedere molte ore/operatore e necessitare di un'elevata esperienza interpretativa. Ricorrere a metodi di screening per individuare le urine che presentano una CM o, di contro, per rilevare le urine negative, può essere di aiuto nel contenere il numero di campioni sui quali effettuare successive indagini per confermare la presenza di PBJ. Tra i metodi di screening più utilizzati per selezionare le urine negative si annoverano quelli immunochimici il cui principio si basa sulla determinazione, mediante turbidimetria o nefelometria, dell'immunocomplesso che si forma qualora le FLC siano presenti nel campione di urine (13, 14). Il vantaggio di questi metodi consiste nell'utilizzo di urine non

Corrispondenza a: Patrizia Natali, Corelab NOCSAE - AUSL Modena. Via Giardini 1355, 41126 Baggiovara (Modena). Tel. 0593961077, Fax 0593961200, E-mail p.natali@ausl.mo.it

Ricevuto: 01.08.2016

Revisionato: 10.10.2016

Accettato: 25.10.2016

Pubblicato on-line: 08.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.020

concentrate e di essere automatizzabili e quindi facilmente implementabili in laboratori con elevato numero di campioni da processare giornalmente.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'accuratezza della determinazione delle FLC urinarie mediante immunonefelometria (INA) confrontandola con il metodo uIFE, al fine di considerarne il possibile impiego come metodo di screening e diminuire il numero di campioni da sottoporre a uIFE.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo 1 luglio-7 agosto 2015 sono pervenuti al Laboratorio Corelab NOCSAE 1000 campioni di urine del mattino con la richiesta di ricerca di PBJ. Tutti i campioni sono stati utilizzati per lo studio senza alcuna selezione da parte dagli operatori.

Le urine non concentrate sono state sottoposte al test di screening per rilevare i campioni PBJ negativi con INA utilizzando gli antisieri del kit Free Light Chains (New Scientific Company) su nefelometro Immage (Beckman Coulter). Le istruzioni fornite da New Scientific Company suggeriscono di considerare positivi ai fini dello screening, i campioni di urina che presentano una concentrazione di FLC >10 mg/L (INA-10); la stessa ditta propone anche un protocollo operativo alternativo che indica di abbassare tale cut-off a >5 mg/L (INA-5).

Entro le 24-48 ore successive, i campioni di urina conservati a 4 °C erano sottoposti a uIFE. Nello studio si è adottata un'uIFE su gel di agarosio semplificata (uIFE-3), impiegando per ogni campione 3 sole corsie di antisieri: prima corsia, "pool" anti-catene pesanti (anti-GAM); seconda corsia, anti- $\kappa$  totali; terza corsia, anti- $\lambda$  totali (16). È stato utilizzato il kit 9 Hydragel IF per maschera dinamica, colorante violetto acido, soluzione fissativa dedicata, (Sebia). Ogni quadrante previsto per la corsa di un solo campione veniva suddiviso in 2 parti per testare due campioni, consentendo così di processare contemporaneamente 18 urine, ottimizzando tempi di esecuzione e costi. Si è evitato l'uso degli antisieri anti-FLC perchè poco specifici, mostrano spesso scarsa avidità e, non da ultimo, sono costosi; sono stati solo impiegati per confermare la PBJ quando presente anche un'immunoglobulina completa (13, 14, 17, 18).

Per approfondimenti si è utilizzato il kit Hydragel 2/4 Bence Jones (Sebia) con maschera standard, seguendo le indicazioni fornite dalla ditta, con antisieri anti-GAM, anti- $\kappa$  totali e anti- $\lambda$  totali, anti- $\kappa$  libere e anti- $\lambda$  libere o con combinazione di antisieri anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM, anti- $\kappa$  totali e anti- $\lambda$  totali. Il limite di rilevabilità di PBJ dichiarato dal produttore con l'utilizzo di antisieri anti-catene totali è <5 mg/L, inferiore al limite suggerito in letteratura (10 mg/L) (13, 14, 17, 18).

Sono state considerate positive, quindi da sottoporre a ulteriori conferme, sia le urine che con INA mostravano una concentrazione di FLC >10 mg/L (INA-10), che le urine con concentrazione di FLC >5 mg/L (INA-5). I due gruppi di dati ottenuti in riferimento ai due diversi valori

soglia sono stati separatamente confrontati con uIFE calcolandone gli indici di accuratezza diagnostica.

Per il calcolo statistico è stato utilizzato il software MedCalc per Windows.

Il presente lavoro ha rispettato la Dichiarazione di Helsinki del 1975 in relazione agli aspetti etici.

## RISULTATI

È stata studiata una popolazione di 1000 pazienti, di cui 481 (48,1 %) maschi, con un'età compresa tra 15 e 95 anni (media, 67 anni). Di questi, 701 (70,1%) erano soggetti ambulatoriali.

Dei pazienti studiati, 45,9% è pervenuto in laboratorio con un'indicazione del medico prescrittore per la richiesta di determinazione di PBJ: tale indicazione era presente nel 13,7% dei pazienti interni e nel 59,6% degli esterni. La richiesta più frequente (38,3%) era relativa alla verifica dell'idoneità alla somministrazione di un mezzo di contrasto, seguita dall'indicazione di gammopatia monoclonale (GM) (20,9%) (Tabella 1).

La determinazione della PBJ mediante uIFE-3 ha prodotto 77 CM rilevate, di cui 71 PBJ positive, mentre 929 sono i campioni risultati negativi per PBJ, dei quali 6 presentavano un'immunoglobulina completa.

Sono risultati positivi con INA-10, 153 campioni, dei quali però solo 39 (25,5%) si sono confermati con uIFE, mentre i rimanenti 114 (74,5%) sono risultati negativi (falsi positivi). Diminuendo il valore soglia a 5 mg/L, i campioni positivi, da sottoporre quindi a ulteriore conferma, aumentavano a 289, ma una volta processati con uIFE solo 53 (18,3%) hanno mostrato positività a PBJ, mentre i restanti 236 (81,7%) hanno dato un risultato negativo (falsi positivi).

I campioni positivi per PBJ con INA-10 sono stati 39 (54,9%) su 71 rilevati con uIFE, mentre 32 (45,1%) non sono stati individuati (falsi negativi). Nel caso di INA-5, i campioni positivi a PBJ sono stati 53 (74,6%) su 71, mentre 18 (25,4%) non sono stati rilevati (falsi negativi). Il dettaglio dei risultati ottenuti è riportato nella Tabella 2.

Nella Figura 1 si nota come i due valori soglia adottati per INA non concorrono a creare un efficace discrimine tra urine PBJ negative e positive. Si evidenzia, inoltre, come i campioni PBJ negativi mostrino concentrazioni di FLC molto sovrapponibili a quelli positivi, soprattutto per le catene leggere  $\kappa$ , mentre si rileva una maggiore, benché non esaustiva, capacità di distinguere i campioni positivi per catene leggere  $\lambda$ .

Prendendo a riferimento i dati ottenuti con uIFE, la prevalenza di PBJ nella popolazione esaminata è di 7,1%. La metodica INA, sia nel caso di INA-10 che INA-5, confrontata con uIFE-3, differiva nei risultati in modo statisticamente significativo ( $P < 0,001$ ) (test di McNemar). L'analisi della concordanza diagnostica tra INA e uIFE-3 ha evidenziato i risultati riportati nella Tabella 3.

**Tabella 1**

Indicazioni per la richiesta di determinazione di proteinuria di Bence Jones (PBJ) nella popolazione valutata (dove presenti)

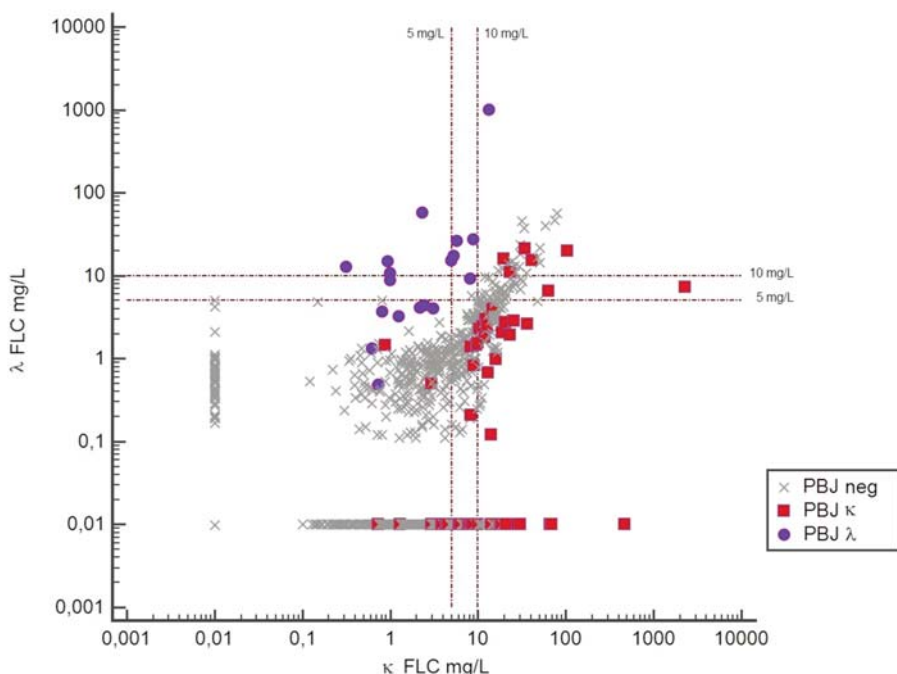
Indicazione	Pazienti degenti	Soggetti ambulatoriali	Totale
Idoneità all'impiego di mezzo di contrasto	10 (24,4%)	166 (39,7%)	176 (38,3%)
Gammopatia monoclonale	8 (19,5%)	88 (21,1%)	96 (20,9)
Insufficienza renale cronica/acuta	1 (2,4%)	10 (2,4%)	11 (2,4%)
Discrasia plasmacellulare	1 (2,4%)	4 (1,0%)	5 (1,1%)
Controllo	6 (14,6%)	47 (11,2%)	53 (11,5%)
Altro	15 (36,6%)	103 (24,6%)	118 (25,7%)

**Tabella 2**

Confronto tra i risultati ottenuti con la metodica immunonefelometrica (INA) e la metodica di immunofissazione (uIFE), considerando positivi i campioni con concentrazione di catene leggere libere (FLC) >10 mg/L (INA-10) e FLC >5 mg/L (INA-5). La percentuale è riferita al numero di campioni PBJ+ o PBJ- determinati mediante uIFE

	INA-10 pos	INA-10 neg	INA-5 pos	INA-5 neg	uIFE
PBJ positiva	39 (54,9%)	32 (45,1%)	53 (74,6%)	18 (25,4%)	71 (100%)
PBJ negativa	114 (12,3%)	815 (87,7%)	236 (25,4%)	693 (74,6%)	929 (100%)
Totale	153 (15,3%)	847 (84,7%)	289 (28,9%)	711 (71,1%)	1000 (100%)

PBJ, proteinuria di Bence Jones.



**Figura 1**

Distribuzione di urine negative e positive alla proteinuria di Bence Jones (PBJ) ( $\kappa$  e  $\lambda$ ) in funzione della concentrazione di catene leggere libere (FLC) determinata con immunonefelometria (INA).

I tratteggi orizzontali e verticali evidenziano i valori di concentrazione di FLC >10 mg/L e FLC >5 mg/L, rispettivamente, di  $\kappa$  e  $\lambda$  rilevati con INA. Si noti la più efficace, benchè non esaustiva, capacità di INA di individuare campioni PBJ- $\lambda$  positivi in funzione della concentrazione di  $\kappa$  e  $\lambda$  libere; i campioni PBJ- $\kappa$  positivi presentano invece concentrazioni di  $\kappa$  e  $\lambda$  libere poco distinguibili da quelli PBJ negativi.

**Tabella 3**

Confronto dei parametri di accuratezza della metodica immunonefelometrica (INA) in riferimento alla metodica di immunofissazione semplificata (uIFE-3), considerando positivi i campioni con una concentrazione di catene leggere libere >10 mg/L (INA-10) o >5 mg/L (INA-5)

Parametro	INA-10	CI 95%	INA-5	CI 95%
Sensibilità	54,9%	42,7% - 66,8%	74,7%	62,9% - 84,2%
Specificità	87,7%	85,4% - 89,8%	74,6%	71,7% - 77,4%
Prevalenza nella popolazione studiata	7,1%	-	7,1%	-
Valore predittivo positivo	25,5%	18,8% - 33,2%	18,3%	14,1% - 23,3%
Valore predittivo negativo	96,2%	94,7% - 97,4%	97,5%	96,0% - 98,5%
Rapporto di verosimiglianza positivo	4,48	3,41 - 5,88	2,94	2,47 - 3,50
Rapporto di verosimiglianza negativo	0,51	0,40 - 0,66	0,34	0,23 - 0,51
Accuratezza diagnostica	85,4%	83,1% - 87,5%	74,6%	71,8% - 77,2%
Coefficiente k di Cohen	0,28	0,20 - 0,36	0,20	0,15 - 0,26

CI, intervallo di confidenza.

## DISCUSSIONE

Dai dati ottenuti si evince come la metodica INA, sia nella sua declinazione INA-10 che in quella INA-5, presenti carenze nel rilevare la presenza di FLC monoclonali. I risultati ottenuti considerando distintamente i due valori soglia non differiscono tra loro significativamente: in entrambi i casi il valore predittivo positivo è scarso, mentre apparentemente buono il valore predittivo negativo per la valutazione del quale, però, bisogna tenere conto della prevalenza da cui è dipendente, che è bassa nella popolazione presa in esame, anche a causa della scarsa appropriatezza dell'indicazione per la richiesta di PBJ. Poco significativi sono anche gli altri elementi di correlazione valutati, ma il parametro che offre una sintesi del confronto dei metodi presi in esame è il coefficiente k di Cohen, che mostra come con entrambi i valori soglia considerati la concordanza diagnostica tra INA e uIFE sia molto bassa.

In sintesi, la metodica INA presenta importanti criticità. Con INA-5, oltre alla presenza di falsi negativi, si osserva che approssimativamente un campione su 3 risulta positivo; per la quasi totalità si tratta di falsi positivi: un numero così elevato di campioni da inviare a ulteriori indagini mette in discussione il ruolo stesso di esame di screening che la metodica dovrebbe rivestire. Con INA-10 invece, pur essendo presenti falsi positivi, particolarmente evidente è l'elevato numero di falsi negativi: quasi la metà dei campioni PBJ positivi non viene rilevata dalla metodica.

Se rinvenire un elevato numero di campioni falsi positivi incide principalmente sugli aspetti gestionali e organizzativi del laboratorio, il riscontro di falsi negativi ha ripercussioni che investono soprattutto il piano clinico con il rischio di fornire al curante dati inaccurati con conseguenze dirette sulla gestione del paziente.

L'utilizzo di metodi in automazione, quali INA, comporta indubbi vantaggi sull'efficienza operativa, ripetibilità analitica e facilitazione nell'interpretazione del risultato. Non vanno, tuttavia, sottovalutate le criticità

insite in questo metodo. Il calibratore è policlonale e può non reagire in modo analogo con le FLC monoclonali eventualmente presenti nel campione del paziente. E' inoltre utile ricordare che nelle urine sono presenti FLC policlonali in quantità variabile in funzione della patologia, che possono interferire con la determinazione di FLC monoclonali, inficiandone così l'accuratezza a causa di false positività dovute a reattività crociate. Da non sottovalutare è anche la variabilità esistente tra i lotti di reagente. Oltre a ciò occorre tenere presente che la molecola della PBJ ha struttura e PM variabili ed è estremamente labile, soprattutto in una matrice complessa come quella urinaria; infine, la metodica non è in grado di rilevare eventuali immunoglobuline complete, che è invece opportuno segnalare. La quantità di PBJ, inoltre, nelle urine può variare da pochi mg/L ad alcuni g/L ed è pertanto possibile incorrere nelle condizioni di eccesso di antigene. L'individuazione dell'eccesso di antigene con il metodo INA impiegato richiede elevata esperienza nella valutazione dei risultati non essendo previsto un rilevamento automatico della cinetica di reazione che possa dare indicazioni in tal senso. Occorre quindi una preliminare valutazione complessiva del paziente (diagnosi, esame del quadro elettroforetico e FLC sieriche, risultati precedenti se presenti, ecc.), dati di cui non sempre il laboratorio è a conoscenza. In pazienti senza elementi diagnostici a cui riferirsi, o in caso di incongruenza con i dati a disposizione, per escludere la presenza di eccesso di antigene in campioni con bassa concentrazione di FLC è necessario procedere a diluizioni seriali in progressione logaritmica fino a che il valore ottenuto assume un andamento lineare rispetto la diluizione applicata (19-21).

Per le criticità sopra elencate, INA si rivela una metodica poco specifica con evidenti complessità di gestione nonostante le potenzialità offerte dall'automazione.

uIFE è il metodo raccomandato per la determinazione di PBJ; per aumentarne la sensibilità

viene generalmente suggerito di concentrare le urine (6, 13, 14, 17, 18). Non è tuttavia descritto in letteratura un metodo condiviso e univoco per la concentrazione delle urine, né relativamente alle modalità da utilizzarsi, né al limite al quale arrivare senza il rischio di denaturare il campione; sarebbe pertanto importante armonizzare le modalità operative in tal senso. La concentrazione delle urine produce un probabile aumento del rumore di fondo, che può mascherare la CM; inoltre, qualsiasi modalità di concentrazione può portare alla perdita di materiale proteico in modo non lineare; infatti, alcune proteine si degradano o vengono adsorbite più di altre, specialmente in un fluido biologico disomogeneo come le urine (22).

La possibilità di analizzare le urine con uIFE senza ricorrere alla preventiva concentrazione delle stesse evita le problematiche prima descritte, oltre a influire positivamente sui tempi di lavorazione e sui costi. Solo per alcuni casi particolari, in presenza di un forte sospetto clinico soprattutto di amiloidosi AL o LCDD, quando i metodi usuali non rilevano la presenza di PBJ, si rende necessario procedere alla concentrazione del campione.

La tipologia di casi raccolti in questo studio merita un'ulteriore considerazione: è infatti interessante notare come sia elevato il numero di richieste che riportino come indicazione per la ricerca di PBJ la valutazione dell'idoneità all'impiego di mezzi di contrasto, utilizzando di fatto la PBJ impropriamente come indicatore di danno renale (23, 24). Il fattore di rischio più importante in relazione alla nefropatia indotta da mezzo di contrasto è rappresentato dall'insufficienza renale cronica. Non esistono evidenze che supportino l'ipotesi che una GM possa rappresentare un fattore di rischio di nefropatia da mezzo di contrasto in pazienti ben idratati al momento dell'esame e con funzione renale fisiologica; non sono quindi ritenuti necessari esami di laboratorio volti ad accertare la presenza di una CM sierica o urinaria (24). La conseguenza della consuetudine descritta, tuttavia, è che in laboratorio giunge un numero elevato di richieste di PBJ con indicazione per l'idoneità all'utilizzo del mezzo di contrasto, buona parte delle quali negative in quanto relative a pazienti non affetti da patologie riconducibili a GM. Questo rafforza la necessità di individuare un metodo di screening semplice e sicuro al fine di sottoporre a successive indagini di conferma un numero più limitato di campioni.

Diversi autori hanno evidenziato i limiti di INA per la determinazione della PBJ (9, 13, 14); tuttavia, non vi sono in letteratura studi recenti che abbiano messo tale metodo a diretto confronto con uIFE per valutarne l'accuratezza diagnostica. I dati riportati nello studio dimostrano come la metodica INA risulta inadeguata come metodo di screening anche per la sola individuazione dei campioni negativi alla PBJ. Testare direttamente le urine con uIFE-3 evidenzia importanti vantaggi, tra i quali l'utilizzo di urine non concentrate, la possibilità di processare 18 campioni contemporaneamente così da potere corrispondere a elevati volumi analitici e infine individuare

immunoglobuline complete (16). Da non sottovalutare è, inoltre, l'aspetto economico/organizzativo: ogni determinazione con INA comporta oltre al costo dell'analisi, che talvolta deve essere ripetuta in diluizioni seriali per verificare l'eventuale eccesso di antigene, il costo delle successive uIFE comunque necessarie per confermare i numerosi campioni positivi allo screening nefelometrico. Effettuare direttamente uIFE-3 su tutte le urine permette di determinare e di caratterizzare morfologicamente PBJ nella quasi totalità dei casi in un unico passaggio, consentendo così di abbattere significativamente i costi mantenendo pressoché invariate le ore/operatore impiegate.

Anche nella sua versione semplificata, uIFE rimane pur sempre un esame operatore dipendente che richiede un impegno manuale. Se è quindi importante continuare la ricerca di esami di screening che sempre più rispondano alle esigenze di semplificazione e di efficienza produttiva, è altrettanto importante incoraggiare i medici curanti a seguire linee guida e protocolli diagnostici orientati all'appropriatezza e all'efficacia prescrittiva.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i tecnici del Settore Elettroforesi (Lucia Lezzi, Angela Quagliarella, Angela Lodesani, Liliana Taglini, Daniela Zappaterra, Erica Montanari, Linda Martinelli, Vincenzo Gasparini).

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:538-48.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
3. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
4. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. on behalf of the International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
5. Caldini A, Graziani MG, per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio Proteine. L'aggiornamento dei criteri per la diagnosi di mieloma multiplo da parte dell'"International Myeloma Working Group". *Biochim Clin* 2015;39:275-80.
6. Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
7. Dolci A, Infusino I, Mozzi R, et al. Indicazioni per il corretto impiego delle indagini biochimiche nelle gammopatie monoclonali con particolare riferimento alla

- determinazione delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero. *Biochim Clin* 2008;32:564-68.
8. Beetham R. Detection of Bence Jones protein in practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:563-70.
  9. Merlini G. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012;36:26-8.
  10. Gillmore JD, Wechalekar A, Bird J, et al. Guidelines on the diagnosis and investigation of AL amyloidosis. *Br J Haematol* 2015;68:207-18.
  11. Weber N, Mollee P, Augustson B, et al. Management of systemic AL amyloidosis: recommendations of the Myeloma Foundation of Australia Medical and Scientific Advisory Group. *Int Med J* 2015;45:371-82.
  12. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:517-22.
  13. Graziani MS, Merlini G, Petrini C for the IFCC Committee on Plasma Proteins and the SIBioC Study Group on Proteins. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:338-46.
  14. Graziani MS, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare - Gruppo di Studio Proteine. Biochim Clin* 2001;25:23-32.
  15. Beetham R, Wassell J, Wallage MJ, et al. Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies? *Ann Clin Biochem* 2007;44:516-22.
  16. Frattolillo D, Peruzzi S, Chiodino C, et al. Accuratezza diagnostica di un'immunofissazione urinaria semplificata per la ricerca e tipizzazione della proteina di Bence Jones. *Biochim Clin* 2015;39:264-9.
  17. Salomo M, Gimsing P and Nielsen LB. Simple method for quantification of Bence Jones proteins. *Clin Chem* 2002;48:2202-07.
  18. Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Working Party on Standardised Reporting of Protein Electrophoresis. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012;49:242-56.
  19. Tate J, Bazeley S, Sykes S, et al. Quantitative serum free light chain assay – analytical issues. *Clin Biochem Rev* 2009;30:131-40.
  20. Vercammen MJ, Broodtaerts L, Meirlaen P, et al. Overestimation of free light chains chain antigen excess rate. *Clin Chim Acta* 2015;444:297-302.
  21. Mussap M. La ricerca della proteina di Bence Jones tra vecchi problemi e recenti raccomandazioni: considerazioni a margine delle linee guida italiane e americane. *Biochim Clin* 2002;26:49-54.
  22. Lindstedt G, Lundberg PA. Loss of tubular proteinuria pattern during urine concentration with a commercial membrane filter cell (Minicon B15 system). *Clin Chim Acta* 1974;56:125-6.
  23. Stacul F, Van der Molen AJ, Reimer P, et al. Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines. *Eur Radiol* 2011;21:2527-41.
  24. Mussap M, Graziani MS, Caldini A, et al. a nome del Gruppo di Studio SIBioC Proteine. Documento di consenso SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) sulla richiesta di esami di laboratorio per la valutazione del danno renale da mezzi di contrasto. *Biochim Clin* 2014;38:140-2.

## Analisi dei profili della troponina T cardiaca ottenuti con spettrometria di massa MALDI nel siero di soggetti sani e malati

Benedetta Rampoldi<sup>1</sup>, Roberta Rigolini<sup>1</sup>, Elena Costa<sup>1</sup>, Chiara Fania<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC SMeL-1 Patologia Clinica e <sup>2</sup>UO Proteomica Clinica, IRCCS Policlinico San Donato, San Donato Milanese, MI

### ABSTRACT

**Analysis of serum cardiac troponin T profiles obtained by MALDI mass spectrometry in healthy and diseased subjects.** Acute myocardial infarction (AMI) is a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Cardiac troponin I and T (cTnT) represent the most sensitive and specific markers for the diagnosis and prognosis of myocardial injury. Technological advancements have made possible to develop a new generation of high sensitive assays able to early identify the myocardial injury. The objective of this study was to analyze sera from healthy controls (n=10; cTnT<14 ng/L; group A), patients with cTnT ranging from 14 ng/L to <50 ng/L (n=10; group B) and AMI patients (n=11; cTnT >50 ng/L; group C), by MALDI mass spectrometry to identify specific profiles discriminating patients from controls. MALDI spectra showed different serum low-abundant low molecular protein profiles in the 3 analyzed groups. In particular, 6 dysregulated peaks (P-value <0.05) discriminate group B from C.

### INTRODUZIONE

L'infarto acuto del miocardio (IMA) costituisce la principale causa di morte e disabilità. Le troponine cardiache T (cTnT) e I sono considerate i marcatori biochimici d'elezione per la diagnosi e la stratificazione del rischio nei pazienti con IMA (1). Negli ultimi anni, l'evoluzione tecnologica ha consentito di sviluppare metodi "ad alta sensibilità", in grado di rilevare concentrazioni di troponina molto basse consentendo così di identificare precocemente un danno miocardico (2). L'accresciuta sensibilità diagnostica comporta un miglioramento nella diagnosi di IMA, ma contemporaneamente apre una nuova serie di valutazioni circa l'utilizzo clinico del dosaggio delle troponine cardiache, il cui cut-off, definito nelle linee guida, corrisponde al valore corrispondente al 99° percentile della distribuzione delle concentrazioni osservate in una popolazione di riferimento (1, 2). L'aumento della sensibilità analitica, infatti, ha consentito di dosare concentrazioni di troponina anche nel sangue di soggetti apparentemente sani. Una possibile ipotesi che spiegherebbe la presenza di troponina nel sangue di soggetti sani è che si verifichi un rilascio di troponina dal "pool" citosolico, dovuto a un fisiologico rimodellamento del tessuto miocardico (3).

Poiché la separazione a livello sierico fra cTnT

citosolica e sarcomerica risulta molto impegnativa, sia a causa dei bassi livelli di concentrazione della frazione citosolica sia a causa della loro identità strutturale, l'approccio qui proposto è quello di individuare ulteriori specie proteiche, che possano essere indicative di necrosi miocardica, come supporto al dosaggio della cTnT. Recentemente, soprattutto grazie allo sviluppo e al miglioramento delle prestazioni della strumentazione, delle procedure di preparazione e manipolazione dei campioni biologici e di elaborazioni bioinformatiche, la spettrometria di massa (MS) ha trovato nuove applicazioni nell'area della scoperta e dello studio di biomarcatori. In particolare, il cosiddetto "profiling" proteico del siero mediante MS "matrix-assisted laser desorption ionization" (MALDI) si configura come uno strumento ad alto "throughput" e dalle alte potenzialità per quanto riguarda screening e supporto alla diagnosi. Nell'ambito delle malattie cardiovascolari, in particolare, il numero di biomarcatori utili da un punto di vista clinico è molto scarso, suggerendo la necessità di individuare ulteriori "alterazioni circolanti".

L'obiettivo primario di questo lavoro è consistito nell'identificare mediante MS MALDI possibili cambiamenti nei profili proteici/peptidici sierici da associare a valori di cTnT cardiaca dosata in elettrochemiluminescenza (ECLIA Cobas e601, Roche Diagnostics). L'obiettivo secondario è consistito

Corrispondenza a: Chiara Fania, Scienze biomediche per la salute, Università degli Studi di Milano, Via F.lli Cervi 93, 20090 Segrate (MI). Tel. 0250330419, Fax 0250330425, E-mail chiara.fania@unimi.it

Ricevuto: 03.11.2016

Revisionato: 13.01.2017

Accettato: 18.01.2017

Publicato on-line: 08.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.017

nell'identificare la presenza nel siero di ulteriori componenti proteiche associabili alla cTnT rilasciata come conseguenza del danno miocardico.

## MATERIALI E METODI

### Campioni e metodi

I campioni di sangue presi in esame sono stati prelevati utilizzando provette prive di anticoagulante e successivamente sottoposti a centrifugazione a 10.000 rpm per 10 min.

Sono stati reclutati per lo studio individui maschi di età compresa tra 45 e 65 anni. I soggetti sono stati suddivisi in 3 gruppi. Come controlli (gruppo A) sono stati reclutati soggetti che rientravano nei criteri di inclusione riportati nella Tabella 1. Nel gruppo B sono stati reclutati pazienti afferenti al Pronto Soccorso con dolore toracico acuto e sospetto diagnostico di IMA, dimessi successivamente con diagnosi di dolore toracico aspecifico, con valori di cTnT compresi tra 14 ng/L e 50 ng/L. Nel gruppo C sono stati reclutati pazienti afferenti al Pronto Soccorso con diagnosi di IMA aventi valori di cTnT >50 ng/L, successivamente ricoverati in Unità Coronarica. I criteri diagnostici utilizzati per la diagnosi di IMA sono stati un'alterazione del tracciato elettrocardiografico e/o un incremento o decremento della concentrazione di cTnT nell'arco di 6-12 ore in un appropriato quadro clinico indicativo di ischemia miocardica (4).

Lo studio è stato impostato affrontando dapprima la caratterizzazione di 45 pazienti (età media $\pm$ SE, 57 $\pm$ 0,9) appartenenti al gruppo B e di 46 pazienti (età media $\pm$ SE; 55 $\pm$ 1,0) con diagnosi di IMA (gruppo C) per quanto attiene il dosaggio della cTnT. Da questa popolazione è stato estrapolato in maniera randomizzata un numero minore di pazienti da sottoporre all'analisi mediante MS MALDI (MALDI "profiling") in modo da poter comparare la componente proteica a scarsa abbondanza e a basso PM dei pazienti appartenenti al gruppo B (n=10) e dei pazienti del gruppo C (n=11), rispetto al gruppo A dei controlli sani (n=10).

Per ogni paziente è stata valutata la funzionalità renale (creatinina, urea, sodio, potassio e cloro), i marcatori di danno epatico [bilirubina, aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT)] e dosati colesterolo totale, trigliceridi, proteina C reattiva, creatinichinasi (CK) e proteine totali nel siero con analizzatore Cobas c501 (Roche Diagnostics). Inoltre, sono stati dosati tireotropina (TSH), mioglobina, massa proteica della CK-MB, cTnT con dosaggio ad alta sensibilità e frammento ammino-terminale del peptide natriuretico di tipo B (NTpro-BNP) con strumentazione Cobas e601 (Roche Diagnostics).

Per quanto riguarda i gruppi B e C, tutti i dosaggi sono stati effettuati a 18 ore dall'insorgenza dei sintomi. Tutti i campioni sono stati congelati a -80 °C per essere successivamente sottoposti ad analisi del profilo sierico mediante MS MALDI. I campioni biologici sono stati raccolti nel rispetto e nell'applicazione della Dichiarazione di Helsinki del 1975.

**Tabella 1**

*Criteri di inclusione dei controlli sani (gruppo A)*

Parametro	Valori
S-Creatinina (mg/dL)	0,70-1,20
S-Urea (mg/dL)	10-50
S-Sodio (mmol/L)	136-145
S-Potassio (mmol/L)	3,5-5,1
S-Cloruri (mmol/L)	98-107
S-Aspartato aminotransferasi (U/L)	<40
S-Alanina aminotransferasi (U/L)	<41
S-Bilirubina totale (mg/dL)	<1,20
S-Proteina C reattiva (mg/L)	<5
S-Tireotropina (mUI/L)	0,27-4,20

### MALDI "profiling"

Per effettuare l'allontanamento delle proteine sieriche più abbondanti, che limiterebbero la rilevazione delle specie presenti in concentrazioni inferiori, è stata eseguita una cromatografia di immunoaffinità utilizzando la colonna da immunodeplezione "Multiple Affinity Removal System" (MARS-Hu14, Agilent Technologies), attraverso la quale sono state rimosse le 13 proteine più abbondanti nel siero (albumina, transferrina, aptoglobina, apolipoproteine A-I e A-II, complemento C3,  $\alpha$ -1-antitripsina,  $\alpha$ -2-macroglobulina,  $\alpha$ -1-glicoproteina acida e immunoglobuline A, M e G). A tal fine, ogni campione sierico (20  $\mu$ L) è stato diluito 4 volte nel tampone A fornito da Agilent Technologies e sottoposto a centrifugazione in filtri da 0,22  $\mu$ m (15.000 g per 15 min; Spin-X di acetato di cellulosa, Corning Inc.) per eliminare l'eventuale particolato presente. Un volume totale di 100  $\mu$ L è stato allora introdotto in un sistema cromatografico HPLC 1200 Series (Agilent Technologies) e sottoposto a frazionamento cromatografico secondo le modalità indicate dal produttore. In particolare, è stato utilizzato un tampone dalle caratteristiche non denaturanti (tampone A) per eluire la frazione a scarsa abbondanza ("low abundant proteins", LAP) di ciascun campione, mentre la frazione ad alta abbondanza ("high abundant proteins", HAP) è stata raccolta in tampone dalle caratteristiche lievemente denaturanti (tampone B) in modo da rompere l'interazione fra gli anticorpi legati alla colonna e le proteine da essi riconosciute. La ripetibilità dell'immunodeplezione è stata ricavata misurando l'assorbanza di un "pool" di campioni di siero iniettato in maniera seriale per 20 volte all'inizio (corse pre-sessione), durante (corse intra-sessione) e dopo (corse post-sessione) la sessione di immunodeplezione dei campioni. Successivamente, dalle frazioni LAP sono stati allontanati i sali contenuti nel tampone A mediante cromatografia a fase inversa, usando una colonna mRP C18 (Agilent Technologies), montata su sistema HPLC 1200 series, ed eluendo le specie proteiche con gradiente di tampone B composto da 0,1% acido trifluoroacetico (TFA) in acetonitrile (da 10% a 70% di

tampone B in 2 min, da 70% a 100% di tampone B in 1 min). In modo analogo al precedente, la ripetibilità di tale passaggio cromatografico è stato monitorato attraverso 20 iniezioni seriali del medesimo campione per 3 volte all'interno della sessione analitica (corse pre, intra e post-sessione). Successivamente, la concentrazione proteica di ciascuna frazione LAP è stata valutata mediante saggio con acido bicianoninico (BCA protein assay, Pierce). Quindi, ciascun campione è stato liofilizzato e risospeso in 0,1% TFA in modo da avere una concentrazione di 1 g/L. 1 µg di ciascun campione è stato deposto in 4 replicati su un supporto metallico AnchorChip (AnchorChip TM/var 384, Bruker Daltonics) insieme alla matrice 2,6-di-idrossiacetofenone (DHAP) alla concentrazione di 15 g/L in etanolo:diammonio idrogeno citrato in rapporto 3:1 e lasciato co-cristallizzare all'aria a temperatura ambiente (5, 6). Il "target" AnchorChip, in particolare, attraverso la presenza di opportune zone ("ancore") idrofiliche poste all'interno di una superficie dalle caratteristiche idrofobiche, offre la possibilità di concentrare ulteriormente il campione che, di fatto, viene caricato in soluzione acquosa. Successivamente, i campioni sono stati analizzati mediante MALDI-MS in un'unica seduta analitica, utilizzando uno spettrometro MALDI Ultraflex III (Bruker Daltonics) dotato di laser "Smartbeam" con frequenza di 200 Hz, in modalità lineare positiva, in un intervallo m/z compreso fra 1500-35000. I parametri strumentali utilizzati sono stati i seguenti: potenziali 1 e 2 della sorgente ionica di 25 kV e 23,5 kV, potenziali delle lenti 6,3 kV, modalità soppressione dei segnali fino a 800 m/z, tempo di estrazione ionica di 100 nsec, voltaggio del "detector gain" 1798 V, "electronic gain" 50 mV/"full scale", velocità di acquisizione 1GS/sec. Gli spettri sono stati acquisiti in modalità completamente automatica per garantirne la riproducibilità attraverso l'utilizzo del programma AutoXecute (Bruker Daltonics), i cui parametri sono stati impostati nel modo seguente: laser al 60%, 1000 spettri totali per ciascun pozzetto e movimento "random" all'interno di ciascun pozzetto con 25 impulsi laser per posizione. Il processo di acquisizione degli spettri di massa è stato monitorato attraverso l'utilizzo di miscele proteiche (Protein Calibration Mix, Bruker Daltonics), che sono state analizzate all'interno della seduta analitica in modo ripetuto (all'inizio e ogni 15 pozzetti, per un totale di 10 volte) e controllando i CV di ciascun segnale (CV massimo accettato 20%).

### Analisi statistica

I parametri biochimici dei diversi gruppi sono stati confrontati in seguito a valutazione della distribuzione (test Kolmogorov-Smirnov con correzione di Lilliefors) e applicazione di test parametrici (Student test e ANOVA con post-hoc test di Bonferroni) o non parametrici (test Kruskal-Wallis e Wilcoxon con post-hoc test di Dunn), considerando una significatività per  $P < 0,05$  (Sigma Stat, Systat Software Inc.). La rappresentatività dei sottogruppi estratti rispetto al campione di partenza è stata valutata mediante t-test.

Per quanto riguarda il MALDI "profiling", l'analisi statistica e la valutazione di "pattern" spettrali sono stati effettuati mediante l'utilizzo del ClinProTools v. 2.2 (CPT, Bruker Daltonics), un "software" di processamento volto alla visualizzazione e interpretazione dei dati e alla costruzione di modelli predittivi a partire dai profili proteomici ottenuti tramite MS. Tale programma consente di ottenere informazioni semi-quantitative relative ai profili proteici analizzati sottoponendo gli spettri di massa grezzi a diverse operazioni fra cui "smoothing" (algoritmo Savitsky-Golay), sottrazione della linea di base (modalità "top hat" con 10% ampiezza minima della linea di base) e normalizzazione interna di tutti gli spettri. Attraverso tali operazioni, ciascun singolo segnale m/z all'interno di ciascuno spettro è valutato all'interno della stessa categoria di campioni fornendo una stima del CV intra-categoria. Per la natura stessa della ionizzazione MALDI, infatti, l'analisi differenziale è effettuata considerando il valore dell'area inter-categoria che ogni picco possiede, mentre non può essere effettuata un'analisi semi-quantitativa fra picchi presenti nello stesso spettro (specie chimicamente diverse ionizzeranno diversamente e quindi avranno un'area diversa). Sulla base delle informazioni relative al valore dell'area e a quanto è variabile tale valore (CV) all'interno della stessa categoria, viene dato un risultato statistico. Una volta processati i singoli spettri, infatti, il programma calcola lo spettro medio per ogni categoria (gruppi A, B e C nello studio) e lo spettro medio totale utilizzati per l'analisi statistica condotta utilizzando test non parametrici (test Wilcoxon e Kruskal-Wallis), PCA, CV intra-categoria (max 20%) e valutazione delle aree sotto le curve ROC (AUC) (minimo 0,80). L'analisi in questione ha permesso di generare un elenco di picchi differenzialmente espressi fra le varie categorie definiti picchi "migliori separatori".

### RISULTATI

Come riportato nella Tabella 2, l'analisi statistica ha mostrato differenze significative tra il gruppo di controllo A e il gruppo di pazienti che ha sviluppato IMA (gruppo C) per quanto riguarda potassio, proteine totali, colesterolo totale e proteina C reattiva nel siero. Si è osservata inoltre una differenza statisticamente significativa tra gruppo A e gruppo C e tra gruppo B e gruppo C per AST, CK-MB e NT-proBNP.

L'analisi proteomica del siero dal punto di vista tecnico è considerata piuttosto problematica principalmente a causa, oltre che della sua complessità, del "range" dinamico delle specie presenti in soluzione che si estende per 10 ordini di grandezza (7). Sono presenti, infatti, proteine con concentrazioni a livello di g/L fino ad arrivare a specie proteiche presenti a livello femtomolare (molecole di segnale). Per tale ragione in questo lavoro è stata effettuata un'immunodeplezione utilizzando una colonna d'affinità derivatizzata con anticorpi specifici per le 13 proteine più abbondanti nel siero affinché fossero rilevabili le variazioni differenziali a carico di specie presenti in concentrazione dell'ordine dei ng/L. La ripetibilità dell'immunodeplezione e della

**Tabella 2**

Parametri biochimici dei soggetti studiati. I risultati sono espressi come mediana (valore minimo - valore massimo)

Parametro	Gruppo A (n=10)	Gruppo B (n=10)	Gruppo C (n=11)	P
S-Sodio (mmol/L)	142 (138-144)	139 (138-146)	140 (132-144)	NS
S-Potassio (mmol/L)	4,7 (4,2-5,4)	4,3 (3,8-4,9)	4,0 (3,5-5,0)	A vs. C <0,009
S-Cloruri (mmol/L)	104 (100-107)	104 (100-112)	104 (99-109)	NS
S-Creatinina (mg/dL)	0,96 (0,91-1,23)	0,82 (0,50-1,20)	0,89 (0,60-1,60)	NS
S-Urea (mg/dL)	33 (28-66)	26 (20-73)	33 (15-65)	NS
S-AST (U/L)	22 (18-35)	20 (11-30)	99 (15-229)	A vs. C, B vs. C =0,009
S-ALT (U/L)	25 (18-38)	30 (10-67)	31 (15-124)	NS
S-Bilirubina totale (mg/dL)	0,54 (0,32-0,82)	0,47 (0,20-1,20)	0,84 (0,34-1,95)	NS
S-Proteine totali (g/L)	72 (66-75)	66 (60-74)	59 (53-69)	A vs. C <0,0005
S-Colesterolo totale (mg/dL)	191 (171-309)	201 (141-296)	157 (100-194)	A vs. C =0,014
S-Trigliceridi (mg/dL)	119 (72-224)	120 (98-251)	113 (85-166)	NS
S-Proteina C reattiva (mg/L)	1 (0,6-3,9)	3 (0,2-39)	10 (0,7-76)	A vs. C <0,005
S-CK (U/L)	158 (79-419)	129 (27-179)	208 (46-1375)	NS
S-TSH (mUI/L)	1,54 (0,98-2,20)	1,53 (0,009-4,03)	1,49 (0,23-10,76)	NS
S-cTnT (ng/L)	4 (3-8)	19 (16-34)	2420 (87-7090)	A vs. B, A vs. C, B vs. C <0,0005
S-CK-MB ( $\mu$ g/L)	2,5 (1,5-3,5)	2,9 (2,1-3,9)	45 (2,7-172)	A vs. C, B vs. C <0,0005
S-Mioglobina ( $\mu$ g/L)	41 (21-55)	44 (21-110)	51 (26-368)	NS
S-NT-proBNP (ng/L)	25 (13-114)	107 (10-569)	972 (87-8196)	A vs. C, B vs. C <0,0005

NS, differenza non significativa; AST, aspartato amminotransferasi; ALT, alanina amminotransferasi; CK, creatinichinasi; TSH, tireotropina; NTpro-BNP, frammento ammino-terminale del peptide natriuretico di tipo B.

**Tabella 3**

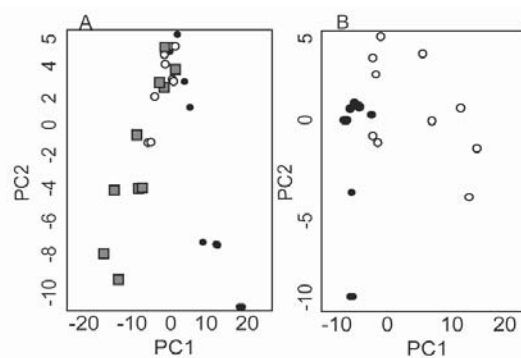
Stima della ripetibilità delle cromatografie di immunodeplezione (ID) e a fase inversa (RP)

	Assorbanza media (mAU)	Media delle medie (mAU)	DS della media delle medie (mAU)	CV
ID Corse pre-sessione	87135,9			
Corse intra-sessione	81917,5	84758,0	2639,8	3,1%
Corse post-sessione	85220,5			
RP Corse pre-sessione	1305,7			
Corse intra-sessione	1375,7	1369,7	61,3	4,5%
Corse post-sessione	1427,9			

successiva fase di allontanamento dei sali sono mostrate nella Tabella 3.

Successivamente, le prestazioni strumentali relative all'analisi MALDI-MS sono state stimate analizzando ripetutamente all'interno della medesima seduta analitica gli spettri relativi a miscele proteiche e valutando il CV di ogni picco, che non è risultato essere maggiore del 8%.

L'analisi statistica delle componenti principali indica che la metodica MALDI è in grado di rilevare variazioni

**Figura 1**

A) Grafico delle componenti principali (PC) basato sui profili sierici del gruppo A (quadrato grigio), del gruppo B (cerchietto bianco) e del gruppo C (cerchietto nero). L'analisi mostra una separazione dei 3 gruppi considerati. B) Grafico delle PC basato sui profili sierici del gruppo B (cerchietto bianco) e del gruppo C (cerchietto nero). L'analisi mostra una separazione dei due gruppi considerati.

nei profili proteici dei 3 differenti gruppi analizzati, rilevando un totale 80 picchi nell'intervallo m/z 1500-35.000, di cui 16 picchi differenzialmente presenti nel confronto delle 3 classi studiate ( $P < 0,05$ ) (Figura 1). In particolare, prendendo in considerazione i profili sierici ottenuti utilizzando le LAP dei gruppi B e C, l'analisi delle componenti principali mostra una separazione tra le due classi (Figura 1B) e la possibilità di rilevare 6 picchi differenzialmente espressi ( $P < 0,05$ ), come indica la

Figura 2, in cui sono mostrati lo spettro medio per i pazienti appartenenti al gruppo B e quello relativo ai pazienti del gruppo C.

Nella Tabella 4 e nella Figura 3 sono mostrati, rispettivamente, le masse dei picchi con la relativa analisi statistica e i picchi stessi insieme ai "box plot" e alle curve ROC. Le specie proteiche differenzialmente presenti fra le classi in esame si estendono nell'intervallo medio-alto dello spettro (da 4591 a 25.863 m/z) e sono tutte maggiormente presenti nel gruppo 3 in percentuale compresa fra 15% e 23%. Inoltre, i CV risultano compresi fra 6,1% della specie a 5080 m/z del gruppo C e 18,7% del picco a 24.808 m/z del gruppo B.

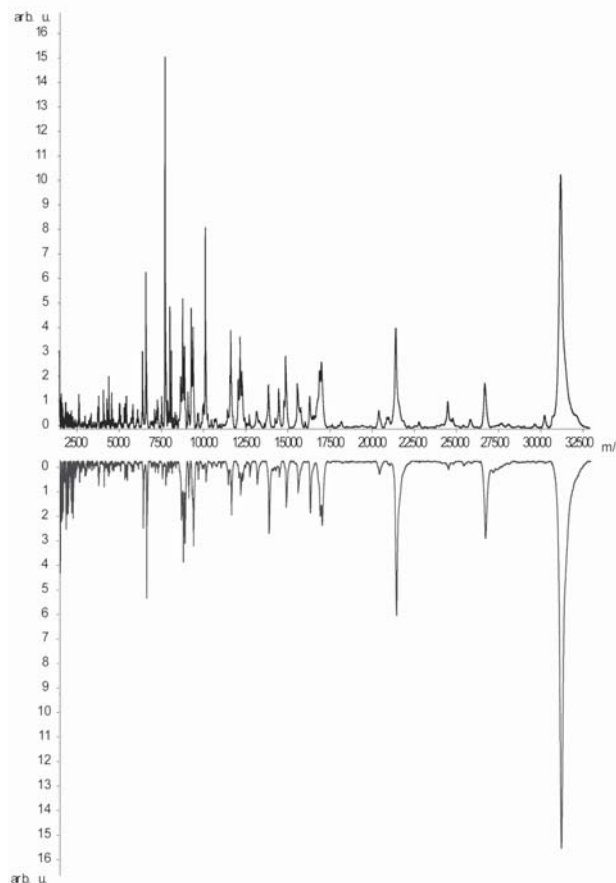
Nella Figura 4A è possibile osservare l'analisi delle componenti principali effettuata prendendo in considerazione i profili sierici ottenuti dalle LAP appartenenti al gruppo A vs. B, mentre nella Figura 4B è possibile osservare l'analisi delle componenti principali effettuata prendendo in considerazione i profili sierici ottenuti dalle LAP appartenenti al gruppo A vs. C; in entrambi i casi è possibile notare una separazione tra le classi confrontate.

## DISCUSSIONE

L'IMA rappresenta attualmente una delle principali cause di morte. Per questo motivo la possibilità di diagnosticare precocemente un evento ischemico diventa fondamentale per poter intervenire tempestivamente iniziando la terapia opportuna. L'elevata sensibilità raggiunta per il dosaggio delle troponine cardiache ha determinato da una parte un miglioramento nella diagnosi di IMA e dall'altra ha aperto nuove problematiche circa l'utilizzo clinico e l'interpretazione dei dosaggi (2). In particolare, il problema riguarda l'interpretazione dei livelli misurabili di troponina nei soggetti apparentemente sani e la possibilità di distinguere incrementi patologici di troponina dovuti a un danno miocardico irreversibile (necrosi miocardica) da quelli dovuti a un danno transitorio e reversibile (8).

Il nostro studio si è posto l'obiettivo di identificare, mediante MS MALDI dei profili sierici caratteristici di un determinato stato fisiopatologico, quale la presenza di IMA. Ci siamo inoltre posti l'obiettivo di identificare la

presenza nel siero di ulteriori componenti proteiche associate alla cTnT rilasciata in seguito a danno miocardico. Questo lavoro si colloca nella fase preliminare di verifica necessaria per una corretta impostazione del disegno sperimentale. In particolare abbiamo considerato 3 categorie di soggetti: individui maschi sani con valori di cTnT <14 ng/L, pazienti maschi afferenti al Pronto Soccorso con dolore toracico acuto e

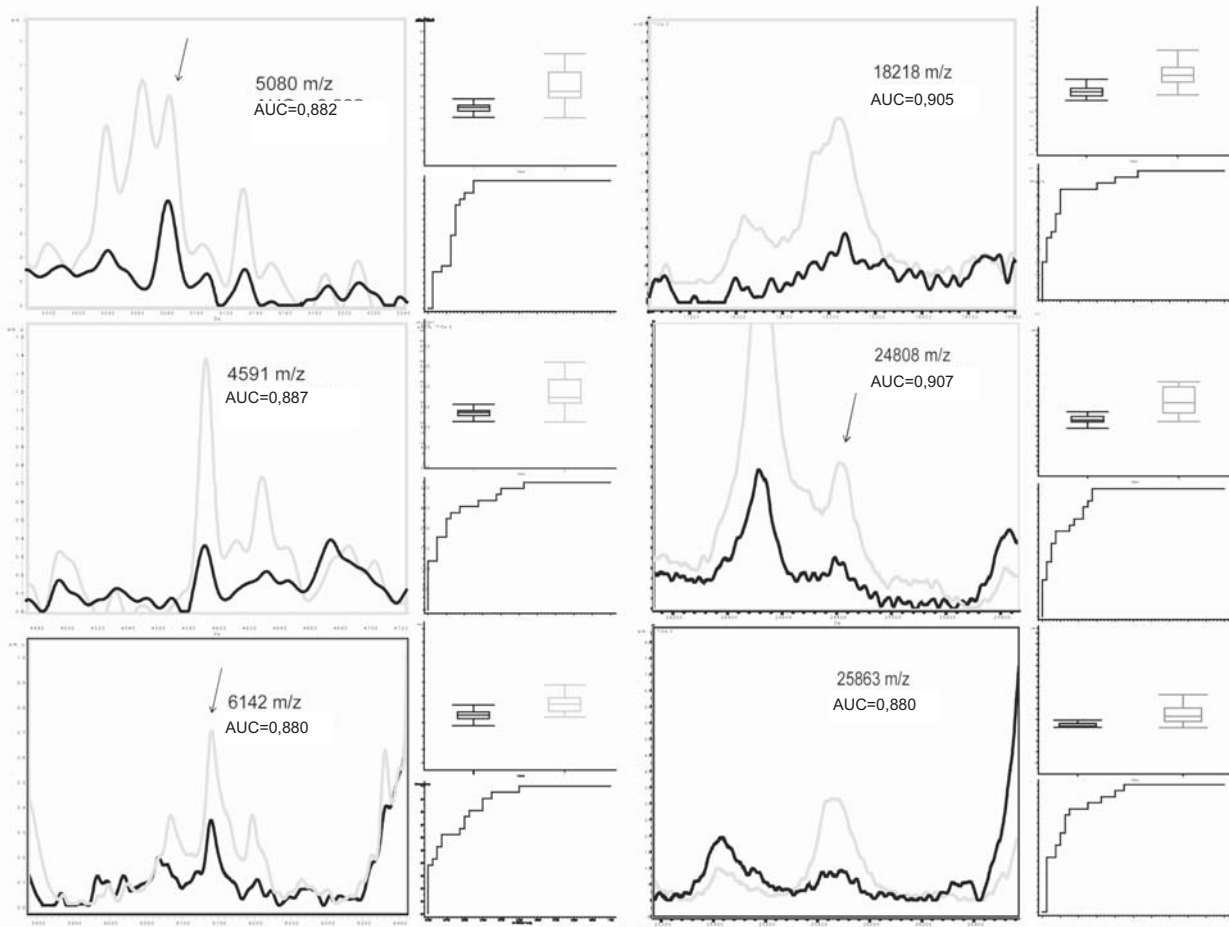


**Figura 2**  
MALDI "profiling" di sieri sottoposti a immunodeplezione (intervallo m/z 1500-35.000) da pazienti del gruppo B (spettro medio, pannello superiore) e da pazienti del gruppo C (spettro medio, pannello inferiore).

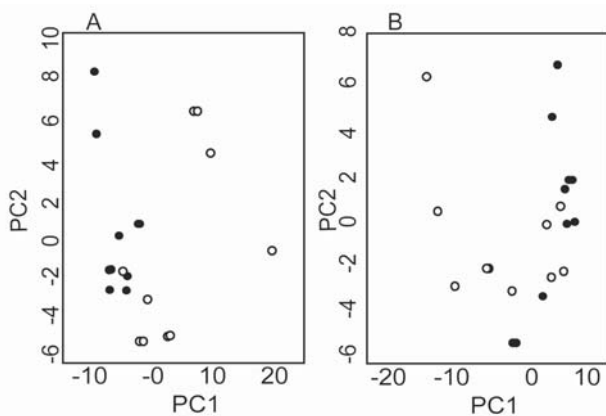
**Tabella 4**

Picchi differenzialmente espressi ( $P < 0,05$ ) ottenuti paragonando sieri di pazienti con valori di troponina T cardiaca (cTnT) compresi tra 14 e 50 ng/L (gruppo B) e sieri di pazienti con valori di cTnT >50 ng/L (gruppo C). Per ciascun picco (valore m/z) sono indicati valore di P, ottenuto utilizzando un test non parametrico (Wilcoxon test), area media e CV

m/z picco	P	Gruppo B area media	Gruppo C area media	CV Gruppo B	CV Gruppo C
4591	0,013	48,11	37,06	18,3%	11,3%
5080	0,012	47,55	38,68	15,4%	6,1%
6142	0,031	90,28	73,42	10,3%	13,5%
18218	0,012	144,49	122,87	7,7%	7,5%
24808	0,012	142,12	109,36	18,7%	6,4%
25863	0,013	208,98	168,75	17,5%	6,9%



**Figura 3**  
 Ingrandimenti dei picchi differenzialmente espressi ( $P < 0,05$ ) ottenuti paragonando sieri di pazienti del gruppo B (spettro medio, linea grigia) e pazienti del gruppo C (spettro medio, linea nera). Per ciascun picco (valore m/z) è indicato il valore di area relativa alla curva ROC (AUC) insieme ai "box plot".



**Figura 4**  
 A) Grafico delle componenti principali (PC) basato sui profili sierici del gruppo A (cerchietto nero) e del gruppo B (cerchietto bianco). L'analisi mostra una separazione dei 2 gruppi considerati. B) Grafico delle PC basato sui profili sierici del gruppo A (cerchietto nero) e del gruppo C (cerchietto bianco). L'analisi mostra una separazione dei 2 gruppi considerati.

sospetto IMA e dimessi successivamente con diagnosi di dolore toracico aspecifico, aventi valori di cTnT compresi tra 14 e 50 ng/L, e pazienti maschi con valori di cTnT >50 ng/L e diagnosi clinica di IMA.

Seppur ciascun segnale presente all'interno del profilo rappresenti un putativo biomarcatore di patologia, questo tipo di analisi semi-quantitativa non fornisce informazioni relative alla sua identità. Per tale ragione, il nostro approccio è proposto come strumento per indagare se esiste un profilo caratteristico della condizione in esame. La potenzialità del "profiling" proteico ottenuto mediante approcci cromatografici accoppiati a MALDI MS, infatti, necessita ancora di standardizzazione e di ulteriori elementi che rendono il tema dell'attendibilità del metodo una questione ancora aperta. Quest'ultimo punto andrebbe affrontato in uno specifico lavoro che preveda, oltre all'identificazione dei picchi, la validazione dell'espressione delle specie proteiche e l'analisi rispetto a standard di riferimento.

Complessivamente, i dati ottenuti indicano che la tecnica MALDI "profiling" è in grado di rilevare variazioni nei profili proteici dei 3 differenti gruppi analizzati. In

particolare, prendendo in considerazione i profili sierici ottenuti dai gruppi B e C si osserva una separazione tra le due classi e la presenza di 6 picchi maggiormente presenti nel siero dei pazienti IMA. Questi risultati preliminari indicano la presenza di un quadro proteico caratteristico di uno stato patologico che si differenzia da quello dovuto a un innalzamento di cTnT non specifico di IMA, lasciando presupporre l'alterazione di un set di specie differenti per quanto riguarda i due eventi.

Uno dei limiti principali di questo lavoro riguarda il numero esiguo di campioni analizzati per ogni categoria, dovuto all'intenzione di valutare la fattibilità di questo tipo di approccio applicato all'utilizzo combinato con cTnT in ambito cardiovascolare. I risultati ottenuti indicano le potenzialità dell'approccio che, tuttavia, data la grande variabilità dovuta all'utilizzo di campioni umani, necessita di una valutazione su una più ampia casistica oltre all'identificazione delle specie proteiche corrispondenti ai picchi statisticamente variati e loro successiva validazione. Inoltre, l'utilizzo di una coorte più ampia permetterebbe anche di valutare la presenza di eventuali sottogruppi all'interno delle categorie. In tal modo si potrebbero ottenere informazioni utili sia per la comprensione dei meccanismi sottesi al danno miocardico, ma anche un set di biomarcatori putativi da affiancare al dosaggio della troponina per distinguere i veri positivi (gruppo IMA) dal gruppo B, con una migliore interpretazione clinica dei dati.

#### RINGRAZIAMENTI

Lavoro supportato da SIBioC - Medicina di Laboratorio, Bando SIBioC 2013 per giovani professionisti di Medicina di Laboratorio al fine di facilitare l'acquisizione di nuove tecnologie.

Si ringraziano la Prof.ssa Cecilia Gelfi (Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano) per il supporto scientifico e per aver

messo a disposizione strumentazione e i reattivi per l'analisi in spettrometria di massa MALDI e il Prof. Marco Massimiliano Corsi Romanelli (Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano) in qualità di Direttore della UOC SMeL-1 Patologia Clinica, IRCCS Policlinico San Donato.

#### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1581-98.
2. Ferraro S, Panteghini M. Laboratory medicine as the science that underpins medicine: the "high-sensitivity" troponin paradigm. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:653-64.
3. Plebani M, Zaninotto M. Cardiac troponins: what we knew, what we know - where are we now? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1165-6.
4. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267-315.
5. Fania C, Vasso M, Torretta E, et al. Setup for human sera MALDI profiling: the case of rhEPO treatment. *Electrophoresis* 2011;32:1715-27.
6. Fania C, Sogno I, Vasso M, et al. A PSA-guided approach for a better diagnosis of prostatic adenocarcinoma based on MALDI profiling and peptide identification. *Clin Chim Acta* 2015;439:42-9.
7. Liunbruno G, D'Alessandro A, Grazzini G, et al. Blood-related proteomics. *J Proteomics* 2010;73:483-507.
8. Lippi G, Cervellin G. Sul significato clinico del dosaggio delle troponine: attuali conoscenze, problemi interpretativi e prospettive. *Recenti Prog Med* 2010;101:423-8.

## False negative results in urinary cocaine drug testing

Marco Agostini<sup>1</sup>, Caterina Renzoni<sup>1</sup>, Dario Melita<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC Laboratorio di Tossicologia, Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche AV1, Pesaro

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Urbino

### ABSTRACT

Cocaine is the most used illicit stimulant in Europe, but there is often a mismatch between actual cocaine consumption and the number of positive samples in urinary test. In this contest, the choice of the optimal cut-off value for the analytic method plays a key role. We reanalyzed 243 urine samples by ultra HPLC-tandem mass spectrometry (UHPLC-MSMS) that previously resulted negative to cocaine immunoassay test (cut-off value >300 µg/L) to identify the presence and amount of cocaine metabolites, estimate the number of false negative results and verify the adequacy to the current urinary cut-off. 131 samples (53,9%) showed the presence of benzoylecgonine in concentrations >3 µg/L. Only in 5 samples out of 99 with screening values >46 µg/L benzoylecgonine was not detected by UHPLC-MSMS, while in all samples with screening value >73 µg/L the presence of cocaine metabolites was confirmed. Our results indicate that the current screening cut-off could be lowered without loss of specificity, resulting in the reduction of false negative and in increased sensibility and detection time.

### INTRODUCTION

Cocaine is the main alkaloid extracted from leaves of the cultivated varieties of *Erythroxylon coca* (1). It was isolated for the first time in 1860 by Dr. Albert Niemann, who described its pharmacological properties, and it is currently the most consumed illicit stimulant in Europe, with a transverse distribution between social class and age groups (2). According to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction Toxic, in 2013 over 800 deaths correlated with the cocaine use were reported. Wide consumption of this substance has a considerable impact in different socio-medical areas, including safety at workplace, medical advisory board driver licensing and the ability to custody of minors. In all these situations it is crucial to identify users in order to intervene preventively both on the administrative and legal side.

In this context, the urinary testing is the first step due to the simplicity of analysis, sample availability and minimally invasive procedure.

According to the decision dated 18/09/2008 (GU N°236 08.10.2008), concerning workplace drug testing, the Istituto Superiore di Sanità guidelines and GTFI (Toxicologists and Forensic Italian Group) guidelines (3, 4), have stated that the urinary analysis should be performed by two steps based on analytical

instrumentation with different chemical and physical characteristics. The first-level analysis ("screening test"), should be performed by immunoassays and the second-level analysis ("confirmatory test") should be performed by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry through which it is possible to identify and quantify each compound present in urine. According to these regulations, the positivity of the samples is related to the presence of cocaine and its metabolites in urine at concentrations that are higher than or equal to cut-off values of the screening and confirmatory analysis, 300 µg/L and 100 µg/L, respectively. All positive samples at screening should be subjected to the second-level analysis, while negative samples are not subject to further investigation and after a variable period of storage are discarded.

Cocaine powder (hydrochloride salt) is usually snorted or taken by intravenous route after solubilization, while freebase form ("crack") is generally smoked (5-7). After intake, cocaine is quickly transformed by chemical and/or enzymatic action (plasma and liver esterases) in the more abundant metabolites benzoylecgonine (BZE) and ecgonine methyl ester (EME) (5, 8-11). Other minor metabolites may be observed in urine after cocaine use, among which ecgonine (EC), norcocaine (NC), norbenzoylecgonine (NBE), m,p-idrossicocaine

Corrispondenza a: Marco Agostini, Laboratorio di Tossicologia, Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche AV1, Via Lombroso 15, Pesaro. Tel. 0721424735, Fax 0721424735, E-mail marco.agostini@sanita.marche.it

Ricevuto: 29.11.2016

Revisionato: 09.01.2017

Accettato: 25.01.2017

Pubblicato on-line: 11.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.025

(m,pOHCO) and m,p-idrossibenzoilecgoinine (m,pOHBE). In simultaneous presence of ethanol, cocaine is further transesterified by liver carboxylesterase-1 to cocaethylene (COCE) (5, 10, 12-14). BZE is the most used target compound in the urinary cocaine test, because abundant, easy to analyze and with a moderate detection time (normally <60 h) (6, 15-17).

During the monitoring of subjects coming from several structures (medical advisory board driver licensing, workplace medicine, drug addiction services, emergency department of mental health, etc.), we became aware that a too large number of samples identified as negative with the cocaine screening test had instead high urinary concentrations, above the detection limit (LOD) reported in the screening method, i.e., 4.9 µg/L. Consequently, we performed this study to highlight the number of false negatives and, at the same time, assessing the adequacy of the cut-off screening and confirmation for cocaine and its metabolites, by re-analyzing samples with values below the screening cut-off (300 µg/L) by using ultra HPLC-tandem mass spectrometry (UHPLC-MSMS).

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

BZE, cocaine, COCE, BZE d<sub>3</sub> and cocaine d<sub>3</sub> were supplied by Sigma-Aldrich. Water, acetonitrile, isopropyl alcohol MS grade were supplied by Panreac. Formic acid MS grade was provided by Sigma-Aldrich.

Stock solutions of cocaine, COCE and BZE 1 mg/L and 0.1 mg/L and internal standards cocaine d<sub>3</sub> and BZE d<sub>3</sub> at 1 mg/L were prepared in acetonitrile by means of opportune dilutions. These solutions were stored at -24 °C and used to spike drug-free urine samples to prepare calibration set for UHPLC-MSMS.

ACQ DCT ±25% and Medidrug WDT ±25% lyophilized urine quality controls were stored at 2-8 °C and used within 7 days after reconstitution. These materials were used to determine the accuracy of UHPLC-MSMS calibrations.

### Immunometric screening analysis

Immunoenzymatic method in homogeneous phase [CEDIA (Cloned, enzyme, donor, immunoassay)] was provided by Beckman Coulter. Urine samples were screened for the presence of BZE using an AU680 platform (Beckman Coulter).

The established cut-off for screening (300 µg/L) was used to assign a positive/negative results in the immunoassay procedure. Calibration was carried out at two points, zero and cut-off level. Quality controls were performed in each batch.

### UHPLC-MSMS analysis

Aliquots of 100 µL urine were added into a UHPLC glass vial with 30 µL of internal standard solution (1 mg/L) and 870 µL of water LC-MS grade. The vial was

inverted 3 times before the analysis. Calibration curves were constructed in head of every batch, followed by a negative sample to monitor possible contamination. Calibration curves were obtained by fortifying a negative urine sample at the concentrations of 50, 100, 300, 800 and 2000 µg/L. The internal standard was added at the concentration of 300 µg/L.

The confirmatory analysis were performed on UHPLC system (Nexera X2, Shimadzu) coupled with a triple quadrupole MS (Hybrid System 4000 Qtrap, AB Sciex). Chromatographic separation was performed on Hypersil GOLD PFP column (2.1 mm X 50 mm, 1.9 µm) using a binary gradient: 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile with 5% of water (solvent B). The initial condition was 5% B and the gradient was programmed as follows: 0-0.1 min hold 5% B, 0.1-7.0 min to 70% B, 7.0-7.1 min to 100% B and kept for 3 min. Finally, the initial condition was restored and held for 3 min to reequilibrate the system. The flow rate was kept constant at 0.45 mL/min during the analysis (13 min); column temperature was set at 40 °C.

The resolved analytes were ionized via electrospray ionization (ESI) and detected using the QTrap MS operating in multiple reaction monitoring experiment (MRM). The ESI source operated in positive mode at the following conditions: curtain gas (CUR) 30.0 psi, ion spray voltage (IS) 2000 V, temperature (TEM) 550 °C, ion source gas 1 (GS1) 40.0 psi, ion source gas 2 (GS2) 55.0 psi. The MRM transitions were experimentally established and the acquisition was carried out with a scheduled algorithm (AB SCIEX Scheduled). The parameters are shown in Table 1. For each compound, two MRM transitions were monitored. The first transition was used for quantification. For positive identification of analytes, the retention time (RT) and ion ratios have to be within ±2% and ±20%, respectively, when compared to those of calibrating standards.

### Confirmatory analysis validation protocol

During the validation protocol of the confirmatory UHPLC-MSMS method the following parameters were determined: LOD, limit of quantification (LOQ), imprecision, recovery, selectivity, linearity, carryover and matrix effect. The LOD was determined as the lowest concentration producing an acceptable peak shape qualifier/quantifier ion ratio, and a signal-to-noise ratio of at least 3. LOD resulted to be 3, 1 and 3 µg/L for BZE, COCE and cocaine, respectively. LOQ was set at 50 µg/L for all three analytes, after recovery (±20%) and imprecision (<15% CV) verification.

Selectivity was assessed by analyzing blank urine specimens from 25 different individuals and by checking for potential endogenous or external interference. Recovery and imprecision were measured in 10 replicate urine fortified standards at three different concentrations (Table 2). Between-run imprecision was assessed using certified lyophilized urine with value-assigned concentrations (Medidrug WDT Confirm U ±25% and ACQ Science DCT +25% UR), containing BZE. These analyses were performed during one year

**Table 1***Compound-dependent parameters on UHPLC-MSMS*

Compound	RT (min)	MW	Polarity	MRM transition (m/z)	Transition	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Benzoylecgonine	2.75	289.0	Positive	290.1 > 168.2	quant	80	10	30	15
				290.1 > 105.1	qual	80	10	40	12
Cocaine	3.46	303.3	Positive	304.2 > 182.2	quant	90	10	30	10
				304.2 > 82.2	qual	90	10	42	10
Cocaethylene	3.80	317.4	Positive	318.3 > 196.1	quant	96	10	30	12
				318.3 > 82.1	qual	96	10	45	10
Benzoylecgonine d <sub>8</sub>	2.73	297.4	Positive	298.0 > 171.0	quant	80	10	30	13
Cocaine d <sub>3</sub>	3.45	306.4	Positive	307.2 > 185.2	quant	80	10	30	12

RT, retention time; MRM, multiple reaction monitoring; DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential; quant, quantifying transition; qual, qualify transition.

**Table 2***Within-run imprecision and recovery of UHPLC-MSMS (10 replicate measurements)*

Analyte	Concentration (µg/L)	Mean (µg/L)	CV	Recovery
Benzoylecgonine	50	50.4	2.3%	100.8%
Cocaine	50	50.9	1.5%	101.7%
Cocaethylene	50	53.0	1.6%	105.9%
Benzoylecgonine	300	302.1	1.6%	100.7%
Cocaine	300	307.9	1.8%	102.6%
Cocaethylene	300	312.1	1.4%	104.0%
Benzoylecgonine	2000	1914.1	3.8%	95.7%
Cocaine	2000	1902.7	4.2%	95.1%
Cocaethylene	2000	1987.6	3.9%	99.4%

**Table 3***Between-run imprecision and recovery of benzoylecgonine by UHPLC-MSMS*

Material	Concentration (µg/L)	N	Mean (µg/L)	CV	Recovery
Medidrug WDT Confirm U -25 %	114.7	42	112.3	3.8%	97.9%
Medidrug WDT Confirm U +25 %	189.2	33	179.1	3.1%	94.6%
ACQ Science DCT +25% UR	198.5	11	199.2	4.1%	100.4%

period by two analysts. Results are shown in Table 3.

Linear regression data for the fortified samples, 3 replicates of 5 points in different days, had determination coefficient >0.998. Carryover was evaluated from analyses of blank samples (only phase A), injected after fortified samples at 2000 µg/L. The matrix effect was determined by comparison of 4 fortified samples at concentrations of 100 and 300 µg/L. Two samples were prepared in urine matrix while the other two samples in neat solution. The matrix effect was evaluated by comparing the areas of the analytes in urine matrix and neat fortified solutions as per the following formula: matrix effect = [(B/A)-1]\*100, where A is the chromatographic peak area of the standard in neat solution and B is the peak area of the standard spiked into a negative urine. Cocaina, BZE and COCET showed an ion enhancement of 2.56%, 9.95% and 8.06%, respectively.

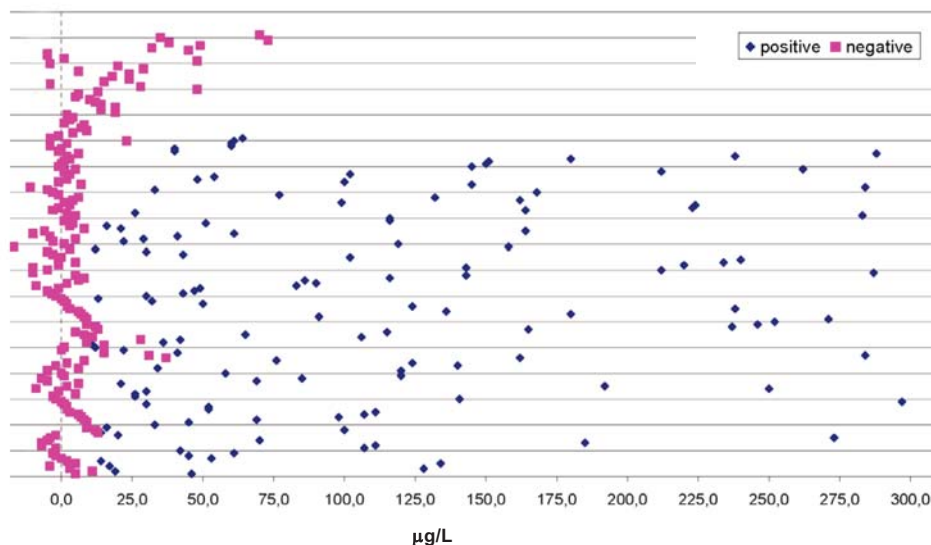
### Study protocol

243 urine samples were selected (August 2015 to August 2016) from those reported as negative with CEDIA technique. These samples were stored at 2-8 °C for a maximum of 48 h, waiting to be analyzed by UHPLC-MSMS in order to identify and quantify the possible presence of BZE, cocaine and COCET. Samples not analyzed within 48 h were stored at -24 °C.

In addition we analyzed, with CEDIA technique 59 urine samples of cocaine nonusers to verify the mean immunoassay response.

### Statistical methods

The MultiQuant software 3.0 (AB Sciex) was used to determine the following parameters: linear regression equation (weighting 1/x), mean, recovery and imprecision (CV).



**Figure 1**  
Negative and positive results in CEDIA studied populations.

		Cocaine and metabolites		
Test (screening)	Present	Absent		
Positive	TP	FP		
Negative	FN	TN		
EWDTS-SAMHSA recommendations		Cut-off, 150 µg/L		
Test (screening)	Present	Absent		
Positive	35	0	Sensitivity 26.7	
Negative	96	171	Specificity 100.0	
CEDIA LOD		Cut-off, 46 µg/L		
Test (screening)	Present	Absent		
Positive	92	5	Sensitivity 70.2	
Negative	39	166	Specificity 97.1	

**Figure 2**  
Sensitivity and specificity of the CEDIA screening method on the evaluated population. TP, true positive; FP, false positive; FN, false negative; TN, true negative; EWDTS, European Workplace Drug Testing Society; SAMHSA, Substance Abuse and Mental Health Administration; LOD, limit of detection; CEDIA, cloned, enzyme, donor, immunoassay.

**RESULTS AND DISCUSSION**

The sensitivity of the screening method was set by adding to the blank mean value 3SD. The mean blank value (true negative samples) was determined by combining the values obtained from 171 negative samples, 59 urine nonusers and 112 unknown patients confirmed being negative by UHPLC-MSMS analysis. The sensitivity of the CEDIA method was found to be 46.2 µg/L.

Of 243 unknown real samples analyzed by UHPLC-MSMS, 131 (53.9%) showed the presence of BZE in concentrations above LOD (3 µg/L). Cocaine was detected in 27 of these samples, while only one sample showed presence of COCET. Six positive samples showed cocaine concentrations considerably higher

than those of the metabolite (from 2.3 to 24.2 times), the urinary pattern found in these subjects suggesting a contamination during sampling.

Cocaine metabolites were not detected in samples with screening values <10 µg/L, while over concentration of 46 µg/L (the CEDIA sensitivity cut-off) only 5 samples showed negativity (false negative rate of 5.1%) (Figure 1).

Our results suggest that the screening cut-off of 300 µg/L, as indicated by current legislation and used by most laboratories in Italy, provides low sensitivity, thus generating a significant number of false negative results. A revision of the cut-off is recommended also in function of the continuous improvement of technological methods, providing higher sensitivity, selectivity and accuracy. Many European and International

organizations took action along this line by fixing the cut-off for screening at 150 µg/L (18, 19). As shown in Figure 2, lowering the cut-off would result in an increase in sensitivity without causing a lowering in the specificity of the screening method, also allowing an increase of the urinary detection time (6, 17). It should, however, be underlined that the choice of an optimal cut-off is an interdisciplinary task, requiring the evaluation of other aspects such as the clinical meaning and the diagnostic value of the urinary metabolites concentrations. This will require the organization of working tables open to all individuals dealing with forensic and legal aspects of the toxicology tests, with the aim of developing common working protocols and guidelines.

Finally, given the great interest of scientific literature for this topic and the excellent analytical performance of UHPLC-MSMS (20-24), we believe that in the future this technique will be used for toxicological screening instead of immunoassays.

## REFERENCES

- Biondich AS, Joslin JD. Coca: the history and medical significance of an ancient andean tradition. *Emerg Med Int* 2016;2016:4048764.
- [www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2016](http://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2016).
- [http://www.iss.it/binary/drog4/cont/Linee\\_Guida\\_Urine\\_xweb.pdf](http://www.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf).
- <http://www.gtff.it/wp-content/uploads/2015/07/LG2012.pdf>.
- Allen KR. Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? *Ann Clin Biochem* 2011;48:531-41.
- Cone EJ, Sampson-Cone AH, Darwin WD, et al. Urine testing for cocaine abuse: metabolic and excretion patterns following different routes of administration and methods for detection of false-negative results. *J Anal Toxicol* 2003;27:386-401.
- [www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2015](http://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2015).
- Kolbrich EA, Barnes AJ, Gorelick DA, et al. Major and minor metabolites of cocaine in human plasma following controlled subcutaneous cocaine administration. *J Anal Toxicol* 2006;30:501-10.
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, et al. Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nucl Med Biol* 2001;28:561-72.
- Heard K, Palmer R, Zahniser NR. Mechanisms of acute cocaine toxicity. *Open Pharmacol J* 2008;2:70-8.
- El Jaoudi R, Humbert L, Grisel F, et al. Case report: silent cocaine poisoning. *Asia Pac J Med Toxicol* 2014;3:87-9.
- Brim RL, Noon KR, Collins GT, et al. The ability of bacterial cocaine esterase to hydrolyze cocaine metabolites and their simultaneous quantification using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Pharmacol* 2011;80:1119-27.
- Cone EJ, Tsadik A, Oyler J, et al. Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration. *Ther Drug Monit* 1998;20:556-60.
- Jufer RA, Wstadik A, Walsh SL, et al. Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. *J Anal Toxicol* 2000;24:467-77.
- Huestis MA, Darwin WD, Shimomura E, et al. Cocaine and metabolites urinary excretion after controlled smoked administration. *J Anal Toxicol* 2007;31:462-8.
- Jagerdeo E, Montgomery MA, Sibum M, et al. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using a completely automated solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Anal Toxicol* 2008;32:570-6.
- Jufer R, Walsh SL, Cone EJ, et al. Effect of repeated cocaine administration on detection times in oral fluid and urine. *J Anal Toxicol* 2006;30:458-62.
- <http://workplace.samhsa.gov/DrugTesting/DTesting.aspx>.
- European Workplace Drug Testing Society. European Guidelines for Workplace Drug Testing in Urine 2015-05-29 Version 02. [www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-urine-guideline-2015-05-29-v02.pdf](http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-urine-guideline-2015-05-29-v02.pdf)
- Romberg RW, Jamerson MH, Klette KL. Rapid analysis of benzoylecgonine in urine by fast gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2006;30:554-8.
- Stout PR, Gehlhausen JM, Horn CK, et al. Evaluation of a solid-phase extraction method for benzoylecgonine urine analysis in a high-throughput forensic urine drug-testing laboratory. *J Anal Toxicol* 2002;26:401-5.
- Williams RH, Maggiore JA, Shah SM, et al. Cocaine and its major metabolites in plasma and urine samples from patients in an urban emergency medicine setting. *J Anal Toxicol* 2000;24:478-81.
- Cao Z, Kaleta E, Wang P. Simultaneous quantitation of 78 drugs and metabolites in urine with a dilute-and-shoot LC-MSMS assay. *J Anal Toxicol* 2015;39:335-46.
- Deventer K, Pozo OJ, Verstraete AG, et al. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *Trends Anal Chem* 2014;55:1-13.

## Intervalli di riferimento standardizzati della fosfatasi alcalina sierica in soggetti pediatrici

Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>, Mauro Panteghini<sup>2</sup>, Elena Guerra<sup>1</sup>, Roberto Leoncini<sup>3,4</sup>, Gabriele Cevenini<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi, Milano

<sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena

<sup>4</sup>UOC Laboratorio di Patologia Clinica - AOU Senese, Siena

### ABSTRACT

**Traceable reference intervals for alkaline phosphatase in serum of pediatrics.** The definition of pediatric reference intervals for alkaline phosphatase (ALP) in serum represents a challenging task due to the high and variable concentrations of this enzyme in children compared to adults. Aim of this work was the establishment of ALP pediatric reference intervals in an Italian population using an indirect method and traceable assays for ALP measurements. A data mining approach involving 12 centers was applied. To verify the analytical quality of the participating centers, 3 pools with ALP target values established by the reference procedure were distributed and analyzed by the centers at the beginning and at regular intervals during the data collection period (May-September 2016). When needed (deviation from target >2%), the results obtained on the 3 pools were used to recalculate ALP results of reference individuals, thus making them traceable to the reference procedure. Each center selected from its database the ALP results of outpatients, aged 0-20 years, excluding those from oncological or orthopedic clinics and the results from subjects that repeated the test more than once. Very high and very low ALP values were investigated for excluding liver, kidney or bone disease. The results were elaborated with a modification of the algorithm proposed by Concordet et al. 4824 ALP values were collected (2372 from females and 2452 from males, respectively). The lower reference limit was the same for boys and girls <12 years old (140 U/L), reaching down the adult concentrations at 16 years for females and 18 years for males. The pubertal peak was at 9-11 years for females (430 U/L) and 12-14 years for males (465 U/L).

### INTRODUZIONE

La definizione degli intervalli di riferimento (IR) in pediatria rappresenta uno dei compiti più difficili per la medicina di laboratorio (1) e, fra tutti gli analiti, quello che pone più problemi è forse la fosfatasi alcalina (ALP). ALP è presente in molti organi, ma in particolare è associata alle superfici cellulari localizzate nella mucosa del piccolo intestino e nei tubuli convoluti prossimali del rene, nell'osso (osteoblasti), nel fegato e nella placenta, ancorata sulla membrana cellulare da glicosilfosfatidilinositolo (2). Nel siero si possono ritrovare forme multiple di ALP, alcune delle quali sono veri isoenzimi, codificati da separati *loci* genetici, mentre le forme di ALP ossea, epatica e renale presentano una struttura primaria comune, codificata dallo stesso *locus* genetico (ALP tessuto-specifica), ma differiscono nel

contenuto di carboidrati (3). Mentre nei sieri di adulti apparentemente sani ALP proviene principalmente dal fegato e in parte minore dall'osso, nei bambini l'attività dell'enzima proviene principalmente dall'osso ed è legata al processo della sua mineralizzazione, particolarmente attivo fino al raggiungimento dell'età adulta. I valori di ALP in età pediatrica variano quindi in base allo sviluppo, raggiungendo il picco in occasione della pubertà. Dato che la pubertà si manifesta nelle femmine con ~2 anni di anticipo rispetto ai maschi, dai 9-10 anni in poi gli IR si differenziano tra i sessi. Questa continua variazione delle concentrazioni di ALP e la differenziazione tra i sessi costringe all'arruolamento di un gran numero di soggetti per la definizione accurata degli IR. Alla difficoltà oggettiva di definire corretti IR si aggiunge il fatto che ancora oggi in Italia, in base ai dati raccolti dal programma di VEQ gestito dal Centro di Careggi a

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano. Tel. 0226432282, Fax 0226432640, E-mail ceriotti.ferruccio@hsr.it

Ricevuto: 15.03.2017

Revisionato: 10.04.2017

Accettato: 27.04.2017

Pubblicato on-line: 08.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.016

Firenze e confermati da Cattozzo (4), ~20% dei laboratori non utilizza metodi che forniscono risultati riferibili al metodo di riferimento IFCC (5).

L'insieme di questi fattori ha generato l'estrema eterogeneità degli IR pediatrici per l'ALP utilizzati oggi in Italia. Un grande progetto canadese (CALIPER – "Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference Intervals") ha fornito dati molto interessanti su questo argomento (6), che però fanno riferimento alla popolazione pediatrica canadese e a uno specifico sistema analitico di cui non è stata dimostrata sperimentalmente la standardizzazione. Si pone quindi il problema di quanto questi IR siano applicabili nel nostro Paese. Purtroppo, la possibilità di replicare un esperimento simile al CALIPER sulla popolazione italiana non era realistica e quindi in questo studio ci siamo orientati verso un approccio basato sul "data mining". Questo approccio per la definizione degli IR, chiamato anche approccio "indiretto", consiste nell'utilizzare i dati già presenti negli archivi elaborandoli con specifici "software" statistici per estrarre dall'insieme dei dati quelli verosimilmente appartenenti a soggetti sani e su questi costruire gli IR. Il principio su cui si basa questo metodo è che comunque la maggior parte dei dati presenti negli archivi appartengano a soggetti che non sono affetti da patologia. Molti autori hanno proposto metodi di calcolo (7-11), anche se questo approccio conserva alcuni limiti importanti. Innanzitutto, se la distribuzione dei dati non è nota *a priori* è impossibile derivarla da dati in cui la percentuale di abnormi è ignota, in particolare se, come spesso accade, la distribuzione non è gaussiana. In genere, poi, non si hanno informazioni sulla qualità analitica con cui i dati sono stati ottenuti e quindi i risultati dell'elaborazione statistica ottenuti in un centro difficilmente sono trasferibili ad altri. Per questi motivi, il documento CLSI EP28-A3 chiarisce che questi metodi "indiretti" possono solo dare una stima approssimativa degli IR (12).

Scopo di questo lavoro è stato quello di definire IR pediatrici per ALP utilizzando un metodo indiretto, ma cercando di superare, almeno in parte, i limiti sopra indicati attraverso una verifica accurata della riferibilità dei dati prodotti dai laboratori che hanno determinato l'ALP e la selezione di una popolazione a bassa prevalenza di soggetti affetti da patologie che comportino alterazione delle concentrazioni ematiche di ALP.

## MATERIALI E METODI

### Schema del progetto

Il progetto ha inteso:

1. verificare, in via preliminare, la standardizzazione della misura dell'ALP nei laboratori dei centri candidati a partecipare allo studio, mediante la distribuzione di appositi campioni biologici con valore assegnato con la procedura di riferimento IFCC e monitorare poi, mediante gli stessi materiali, la qualità dei dati forniti dai centri selezionati durante la fase di raccolta dati, utilizzando eventualmente i dati ottenuti

sui materiali suddetti per correggere i risultati forniti dai vari centri rendendoli equivalenti dal punto di vista analitico (standardizzati) e direttamente riferibili al sistema di riferimento per l'ALP (13, 14);

2. ottenere un numero elevato di risultati di ALP da una popolazione pediatrica non selezionata a priori, ma in cui la prevalenza dei soggetti affetti da patologie che comportino variazione delle concentrazioni sieriche di ALP fosse bassa, coinvolgendo un numero elevato di centri pediatrici;
3. usare approcci statistici adeguati per rielaborare i dati e ottenere gli IR.

### Materiali di controllo

Utilizzando i sieri residui di campioni a cui era stata richiesta la misura dell'ALP sono stati preparati 3 pool con concentrazioni di attività catalitica di ALP di circa 50, 150 e 350 U/L. I pool sono stati suddivisi in aliquote e conservati a -80 °C. 12 aliquote di ciascun pool sono state inviate in ghiaccio secco ai centri partecipanti. A questi 3 pool è stato assegnato il valore mediante la procedura di riferimento IFCC presso il laboratorio di riferimento del Centro di Ricerca per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME) dell'Università di Milano (13). Il valore è stato assegnato mediante analisi ripetute (misure in triplicato per 3 diverse serie analitiche).

I laboratori partecipanti hanno analizzato questi pool in triplicato per 3 giorni consecutivi prima di avviare la raccolta dei dati dei pazienti e poi, almeno in duplicato, una volta a settimana, per le prime 8 settimane di raccolta dati. In 8 centri la raccolta dati è proseguita per altre 10 settimane durante le quali la stabilità del sistema è stata monitorata mediante il programma CQI in uso.

### Soggetti

Sono stati arruolati 12 centri, ma solo 11 hanno inviato dati. Ciascun centro ha raccolto tutti i dati di ALP di soggetti ambulatoriali di età da zero a 20 anni, con i seguenti criteri di esclusione: soggetti che hanno effettuato esami ripetuti oppure che provengono da ambulatori di Ortopedia o Oncologia. Nel caso di neonati, sono stati raccolti solo i dati di soggetti del Nido di ciascun centro. In caso di dati aberranti (rilevati visivamente dopo aver posto in grafico i dati) sono state raccolte informazioni che ne spiegassero l'origine e, di conseguenza, giustificassero l'eventuale eliminazione, come la presenza di concentrazioni plasmatiche di transaminasi oltre 2 volte il limite superiore di riferimento, la positività sierologica (IgM) che indicasse la presenza di infezioni da virus causa di epatopatie acute (epatite B, citomegalovirus, Epstein-Barr) o la presenza di malattia renale glomerulare (creatininemia oltre il doppio del limite superiore di riferimento ripartito per l'età).

### Elaborazione statistica

L'elaborazione dei dati è stata eseguita in due fasi:

- 1) applicazione del metodo proposto da Concordet et al.

(11) per separare la popolazione supposta apparentemente sana dal resto dei dati (anomali); il metodo utilizza l'algoritmo iterativo di aspettativa-massimizzazione per la stima dei parametri di entrambe le distribuzioni gaussiane dei dati Box-Cox trasformati; 2) applicazione del metodo di Cole e Green (15) alla popolazione selezionata come sana per definire i percentili età-dipendenti; il metodo utilizza una trasformazione Box-Cox per descrivere le asimmetrie di distribuzione dei dati e fornisce risultati sufficientemente accurati anche in presenza di un basso numero di osservazioni disponibili. Poiché nella sua formulazione originaria il metodo di Concordet et al. (11) non tiene conto della dipendenza dall'età degli IR, a esso è stata adattata una rete neurale artificiale, capace di effettuare una stima smussata dell'andamento degli IR con l'età.

### Aspetti etici

I risultati sono stati inviati al centro di elaborazione in modo anonimo (erano riportati solo sesso, data di nascita e data del prelievo) e l'elaborazione di tipo cumulativo non consentiva alcuna identificazione del singolo soggetto.

## RISULTATI

### Verifica delle prestazioni dei laboratori partecipanti

I risultati dell'esperimento preliminare sono stati recentemente pubblicati (16). Nella Tabella 1 sono

riportati i risultati ottenuti sui 3 pool durante le 8 settimane di raccolta dati. I risultati, come atteso, non differivano da quelli ottenuti nella prima fase e dimostravano l'ottima stabilità delle prestazioni della maggior parte dei partecipanti, questo anche nelle 12 settimane successive per gli 8 centri che hanno inviato una seconda serie di dati (dati non presentati).

Il valore della pendenza (calcolata con il metodo dei minimi quadrati) ottenuta dalla correlazione dei dati sui 3 pool con valore certificato (media complessiva del periodo di 8 settimane) è stato utilizzato per correggere tutti i dati, riferendoli a quelli che si sarebbero ottenuti con la procedura di riferimento. Dato che l'intercetta non è risultata in nessun caso significativamente diversa da zero, il suo valore non è stato utilizzato per la correzione.

### Dati dei soggetti

Sono stati raccolti 4824 valori di ALP per soggetti tra zero e 20 anni (2372 femmine e 2452 maschi). La distribuzione del numero di soggetti per fasce di età è mostrata nella Figura 1, in cui si osserva un dato abbastanza omogeneo nelle varie classi di età fino ai 14 anni, senza particolari differenze fra maschi e femmine se non nel primo anno di età (rapporto femmine/maschi compreso tra un minimo di 0,66 nel primo anno di età e un massimo di 1,22 nella fascia tra 19 e 20 anni). Sfortunatamente, neonati e lattanti sono risultati molto pochi e non ci hanno permesso di definire dati robusti nei primi 15 giorni di vita.

**Tabella 1**

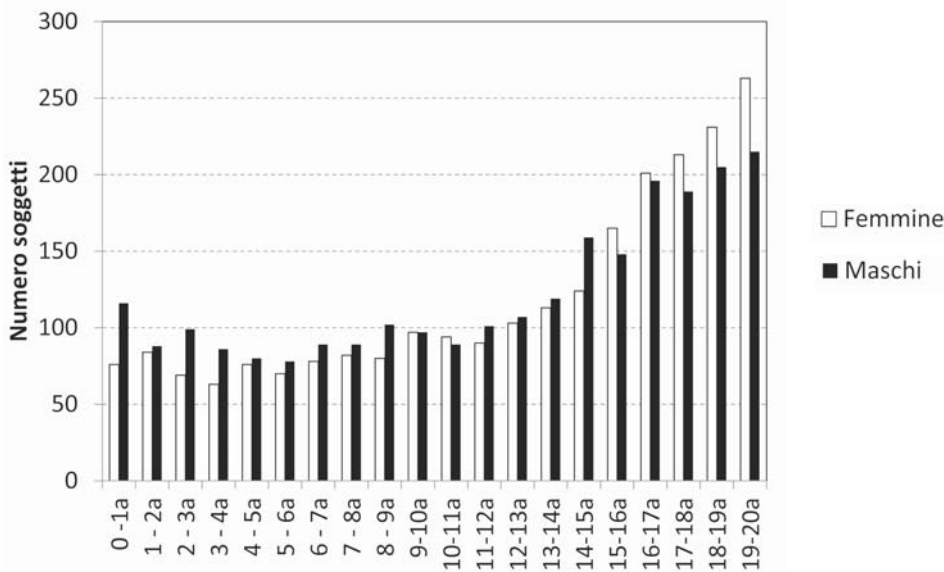
*Risultati ottenuti dai laboratori partecipanti nella fase di raccolta dati sui 3 pool di sieri con valori di fosfatasi alcalina (ALP) assegnati con procedura di riferimento. I 3 pool sono stati analizzati per 8 settimane, all'inizio di ogni settimana, sui sistemi analitici su cui veniva eseguita la misura dell'ALP*

Procedura di riferimento IFCC	n	Pool L		Pool M		Pool H		Confronto con procedura di riferimento		
		Media (U/L)	CV	Media (U/L)	CV	Media (U/L)	CV	Pendenza	Intercetta	r <sup>2</sup>
		59,9 U/L (3,7%) <sup>a</sup>		186,9 U/L (2,8%) <sup>a</sup>		401,5 U/L (2,5%) <sup>a</sup>				
Roche Cobas 6000 <sup>b</sup>	16	56,3	0,5%	174,8	0,9%	368,4	1,1%	0,9127 <sup>c</sup>	2,6 U/L	0,9999
Beckman AU 5822 <sup>b</sup>	16	61,3	2,7%	189,9	2,4%	405,9	2,1%	1,0086	1,0 U/L	1,0000
Roche Cobas 8000 <sup>b</sup>	16	54,9	2,1%	170,9	2,5%	361,9	1,9%	0,8978 <sup>c</sup>	1,9 U/L	1,0000
Roche Cobas 6000/8000 <sup>b</sup>	32	57,5	0,9%	176,6	0,7%	373,2	0,9%	0,9232 <sup>c</sup>	2,9 U/L	1,0000
Beckman AU 680 <sup>b</sup>	54	62,5	1,3%	195,8	1,0%	413,3	1,6%	1,0256 <sup>c</sup>	2,2 U/L	0,9999
Beckman AU 6800 <sup>b</sup>	16	61,8	3,7%	191,1	2,3%	406,8	2,5%	1,0095	1,8 U/L	1,0000
Beckman AU 5800	16	59,7	6,3%	187,9	7,4%	399,3	6,3%	0,9933	1,0 U/L	1,0000
Siemens Advia 2400 <sup>b</sup>	24	58,6	0,9%	180,4	0,9%	385,9	1,0%	0,9580 <sup>c</sup>	1,3 U/L	1,0000
Roche Cobas 8000	16	57,8	2,4%	179,5	1,6%	382,3	1,7%	0,9496 <sup>c</sup>	1,3 U/L	1,0000
Roche Cobas 8000 <sup>b</sup>	32	56,5	1,8%	173,4	2,0%	369,8	1,8%	0,9172 <sup>c</sup>	1,7 U/L	1,0000
Beckman DxCi 600	14	51,6	2,2%	158,0	1,7%	343,3	3,4%	0,8548 <sup>c</sup>	-0,4 U/L	0,9999

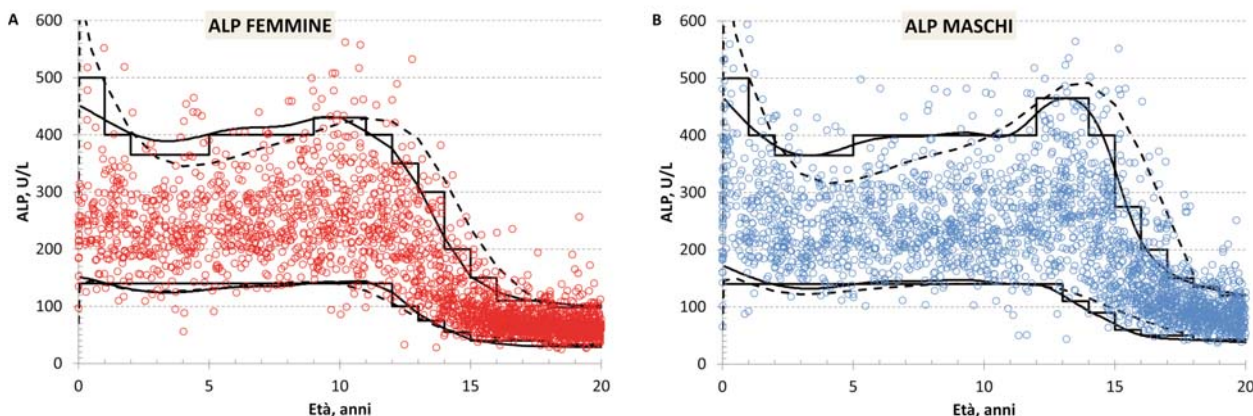
<sup>a</sup>Valore medio (incertezza espansa, k=2).

<sup>b</sup>Centri che hanno proseguito la raccolta per altre 12 settimane.

<sup>c</sup>Valore utilizzato per la correzione dei dati.



**Figura 1**  
Numerosità dei soggetti nelle varie classi di età.



**Figura 2**  
Distribuzione dei risultati. Le linee continue definiscono i limiti di riferimento, rispettivamente, superiore e inferiore definiti con le elaborazioni descritte nel testo. La linea spezzata rappresenta la proposta di suddivisione in classi, derivata empiricamente in base alla distribuzione precedente. La linea tratteggiata rappresenta i dati ottenuti da Zierk et al. (17) su una popolazione tedesca.

La Figura 2 mostra i dati dei soggetti suddivisi per sesso, confrontati con i dati recentemente pubblicati da Zierk et al. (17). Dato che i risultati di questi autori erano ottenuti con sistemi analitici Roche Diagnostics e che, nella nostra valutazione, questi sistemi mostravano una sottostima media del 8% (pendenza calcolata sulla media dei pool misurati nelle due fasi del lavoro dai 5 laboratori che utilizzavano sistemi Roche = 0,92), i risultati sono stati corretti di conseguenza.

La Tabella 2 riporta i valori degli IR dell'ALP suddivisi per classi di età.

**DISCUSSIONE**

La definizione di IR basati su approcci indiretti presenta una serie di limiti, come riassunto in (18), ma il

progetto messo in atto ha cercato di superarne almeno alcuni attraverso un controllo attento della fase analitica (per mezzo dell'uso di materiali commutabili con valore assegnato mediante la procedura di riferimento al fine di assicurare la riferibilità al sistema di riferimento della misura), il coinvolgimento di numerosi centri per ottenere uno spaccato rappresentativo della popolazione pediatrica italiana e l'applicazione di criteri di selezione tali da permettere di limitare significativamente la prevalenza di risultati da soggetti "non sani" nella popolazione selezionata. In particolare, l'applicazione del metodo proposto da Concordet et al. (11) ha scartato solo una piccola percentuale dei dati raccolti.

Come mostrato nella Figura 2, la distribuzione dei valori descritta da Zierk et al. (17) (corretta per la sottostima mostrata dal metodo Roche) si sovrappone in

**Tabella 2**

Limiti di riferimento standardizzati per l'attività della fosfatasi alcalina del siero ottenuti nel presente studio

Femmine			Maschi		
Età (anni)	Limite inferiore (U/L)	Limite superiore (U/L)	Età (anni)	Limite inferiore (U/L)	Limite superiore (U/L)
<1	140	500	<1	140	500
1-<2	140	400	1-<2	140	400
2-<5	140	365	2-<5	140	365
5-<9	140	400	5-<12	140	400
9-<11	140	430	12-<13	140	465
11-<12	140	400	13-<14	110	465
12-<13	100	350	14-<15	90	400
13-<14	75	300	15-<16	65	275
14-<15	55	200	16-<17	50	200
15-<16	40	150	17-<18	50	150
16-<18	40	110	18-<19	43	135
			19-<20	43	120
≥18 <sup>a</sup>	33	98	≥20 <sup>a</sup>	43	115

<sup>a</sup>Dati per la popolazione adulta da rif. (5), riportati per confronto.

larghi tratti a quella calcolata in base ai nostri dati, soprattutto per quanto riguarda il limite inferiore di riferimento. Questo limite è stato spesso trascurato in passato, tanto è vero che, per esempio, Roche Diagnostics fino a ~1 anno fa non lo riportava nei foglietti illustrativi del proprio metodo. Il limite inferiore di riferimento è però importante in quanto valori al di sotto di esso costituiscono l'elemento diagnostico di base dell'ipofosfatasi, una rara patologia genetica (19, 20). Questa patologia ossea, che può essere letale nel neonato, deriva da una carenza congenita dell'isoenzima ALP tessuto-aspecifico e può presentare un ampio spettro di sintomi (fratture spontanee, convulsioni, dolori ossei, perdita prematura dei denti) e di quadri clinici, che la rendono difficile da diagnosticare (19). La mancanza del supporto del laboratorio può notevolmente complicare la situazione e ritardare o impedire la diagnosi; si sospetta infatti che, soprattutto nella popolazione pediatrica, possano esistere un certo numero di forme non diagnosticate (21), ponendo molta enfasi sulla necessità di disporre di IR pediatrici corretti.

I risultati da noi ottenuti si confrontano piuttosto bene sia con i dati dello studio CALIPER (6) che con quelli dello studio di Zierk et al. (17), che però, come detto in precedenza, necessitano di essere rielaborati per essere resi riferibili alla procedura di riferimento IFCC. La Tabella 3 presenta un confronto tra i dati ottenuti in questo studio e quelli dei due lavori citati e con altri di pubblicazione relativamente recente (22-25). Altri dati presenti nella letteratura più datata non possono infatti essere utilizzati perché ottenuti con metodi di misura non riferibili alla procedura di riferimento. Una difficoltà ulteriore nel confronto è legata alla diversa suddivisione

in classi di età operata dai vari autori. Per fare fronte a questo problema e rendere i risultati confrontabili, tutti i dati sono stati rappresentati suddivisi in classi di un anno. Dalla Tabella 3 si può osservare come il limite inferiore di riferimento in età <10 anni non sia mai <104 U/L in tutti gli studi e come tutti gli autori riportino valori identici per maschi e femmine fino a ~10 anni di età. Maggiore variabilità si nota per quanto riguarda il limite superiore di riferimento, sia in termini di valori assoluti che di presumibile picco puberale. Rispetto ai dati CALIPER (6) e a quelli di Zierk et al. (17), che rappresentano sicuramente la fonte più affidabile di informazioni, i nostri indicano un picco puberale di ~1 anno più precoce, sia per i maschi che per le femmine. Questo dato è in accordo con quanto si ritrova in letteratura relativamente all'età media del menarca, che in Italia risulta essere di ~6 mesi più precoce rispetto che in Germania (26). In termini di attività al picco puberale, i valori da noi ottenuti si confrontano meglio con quelli (corretti) di Zierk et al. rispetto a quelli CALIPER.

Il limite principale del nostro lavoro è costituito dalla bassa numerosità dei dati raccolti. Per l'applicazione dei "software" statistici di "data mining", soprattutto su casistiche complesse come questa, sarebbe stato necessario raccogliere un numero di dati 10 volte maggiore per un'elaborazione con un basso livello di incertezza. Il fatto che la popolazione selezionata abbia una bassa prevalenza di patologia e l'applicazione di modalità raffinate di elaborazione dati possono compensare in parte questo limite; tuttavia, rimane un discreto livello di arbitrarietà nei valori riportati in Tabella 2, soprattutto per quanto riguarda il limite superiore di riferimento. Per quanto riguarda i limiti inferiori invece i risultati ottenuti appaiono molto più robusti e la loro affidabilità è confortata dalla ottima sovrapposibilità con i risultati CALIPER, Zierk et al. corretti e "Canadian Health Measures Survey" (CHMS, vedi Tabella 3). Un altro limite è costituito dall'impossibilità di definire con precisione valori per il periodo neonatale e perinatale, dato il numero troppo basso di casi registrati. Per questo periodo, data la buona sovrapposibilità con i risultati ottenuti da Zierk et al. (17) nella restante popolazione, una possibile soluzione per i centri che trattano un numero rilevante di neonati, è quella di adottare i valori proposti nel lavoro di questi autori, eventualmente corretti per il fattore indicato (+8%). Anche in campo neonatale comunque l'utilizzo dei limiti da noi riportati costituisce un'indicazione sufficientemente valida, soprattutto per quanto riguarda il limite inferiore di riferimento, dato molto rilevante per porre un sospetto di ipofosfatasi in un neonato sintomatico.

Dal punto di vista analitico, infine, i risultati di questo studio non fanno che confermare quelli ottenuti nella fase preliminare precedentemente pubblicati (13, 16), indicando uno stato dell'arte della misura dell'ALP ancora lontano dall'ottimale. In particolare, è da notare, come già rilevato da Braga et al. (13), il fatto che Roche Diagnostics continui a riferire il suo metodo a quello pubblicato da Tietz et al. nel 1983 (27) e non al sistema di riferimento IFCC adottato a partire dal 2011, con il

**Tabella 3**  
Confronto fra gli intervalli di riferimento per la fosfatasi alcalina sierica in pediatria (risultati in U/L) presenti in letteratura. In grigio, per ciascun studio sono evidenziati i gruppi di età con i valori più elevati (che dovrebbero corrispondere al picco puberale)

Metodo analitico	Vari		Abbott Diagnostics		Roche Diagnostics		Ortho Clinical Diagnostics		Roche Diagnostics		Non definito		Abbott Diagnostics	
	LIR	LSR	Indiretto	Diretto	Indiretto	Diretto	Diretto <sup>a</sup>	Diretto	Diretto	Diretto <sup>a</sup>	LIR	LSR	LIR	LSR
Tipo di selezione	140	500	Italia	Canada	Germania	Canada	Canada	Danimarca	Corea	Svezia				
Origine dei soggetti	4824	1213	361.405	5032	6203	2474	699							
No. soggetti	Presente studio	CALIPER (6)	Zierk et al. - dati originali (17) <sup>b</sup>	Zierk et al. - dati corretti <sup>b</sup>	Hilsted et al. (23)	Cho et al. (24)	Ridefelt et al. (25)							
Riferimento	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR	LIR	LSR
Genere ed età	140	500	65	589	71	640	-	-	-	-	-	-	-	-
0-14 gg	140	500	133	504	145	548	-	-	-	-	-	-	104	455
15gg-<1 anno	140	400	121	408	132	443	-	-	-	-	-	-	104	455
1-<2 anni	140	365	116	348	126	378	-	-	-	-	-	-	111	277
2-<3 anni	140	365	116	321	126	349	144	327	-	-	117	261	111	277
3-<4 anni	140	365	118	317	128	345	144	327	-	-	117	261	111	277
4-<5 anni	140	400	122	326	133	354	144	327	149	363	117	261	111	277
5-<6 anni	140	400	125	339	136	368	153	367	149	363	123	330	111	277
6-<7 anni	140	400	129	352	140	383	153	367	157	365	123	330	111	277
7-<8 anni	140	400	131	365	142	397	153	367	157	365	123	330	111	277
8-<9 anni	140	430	130	379	141	412	153	367	166	423	123	330	76	479
9-<10 anni	140	430	124	391	135	425	153	367	166	423	123	330	76	479
10-<11 anni	140	400	108	394	117	428	64	359	119	402	123	330	76	479
11-<12 anni	100	350	85	379	92	412	64	359	119	402	123	330	76	479
12-<13 anni	75	300	63	332	68	361	64	359	119	402	61	399	76	479
13-<14 anni	55	200	50	255	54	277	64	359	49	291	61	399	76	479
14-<15 anni	50	150	44	183	48	199	64	359	49	291	-	-	37	222
15-<16 anni	40	110	40	135	43	147	44	107	49	291	-	-	37	222
16-<17 anni	40	110	38	102	41	111	44	107	39	106	-	-	37	222
17-<18 anni	33	98	36	88	39	96	44	107	39	106	-	-	37	222
18-<19 anni	33	98	-	-	-	-	44	107	39	106	-	-	-	-
19-<20 anni														

Femmine

Tabella 3. *Continua*

0-14 gg	140	500	90	273	57	639	62	695	-	-	-	-	104	455
15gg-<1 anno	140	500	134	518	138	531	150	577	-	-	-	-	104	455
1-<2 anni	140	400	156	369	122	404	133	439	-	-	-	-	111	277
2-<3 anni	140	365	156	369	114	327	124	355	-	-	106	261	111	277
3-<4 anni	140	365	156	369	113	294	123	320	144	327	-	106	111	277
4-<5 anni	140	365	156	369	116	290	126	315	144	327	-	106	111	277
5-<6 anni	140	400	156	369	120	301	130	327	144	327	127	370	111	277
6-<7 anni	140	400	156	369	124	316	135	343	153	367	127	370	111	277
7-<8 anni	140	400	156	369	127	330	138	359	153	367	149	345	111	277
8-<9 anni	140	400	156	369	129	341	140	371	153	367	149	345	76	479
9-<10 anni	140	400	156	369	129	353	140	384	153	367	159	365	76	479
10-<11 anni	140	400	141	460	130	373	141	405	153	367	159	365	76	479
11-<12 anni	140	400	141	460	129	401	140	436	113	438	159	365	76	479
12-<13 anni	140	465	141	460	124	434	135	472	113	438	150	492	76	479
13-<14 anni	110	465	127	517	113	454	123	493	113	438	150	492	76	479
14-<15 anni	90	400	127	517	97	440	105	478	113	438	100	402	64	310
15-<16 anni	65	275	89	365	79	382	86	415	113	438	100	402	64	310
16-<17 anni	50	200	89	365	63	291	68	316	56	167	100	402	64	310
17-<18 anni	50	150	59	164	51	193	55	210	56	167	55	242	64	310
18-<19 anni	43	135	59	164	45	144	49	157	56	167	55	242	-	-
19-<20 anni	43	120	-	-	-	-	-	-	56	167	55	242	-	-

Maschi

CALIPER, "Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference Intervals"; CHMS, "Canadian Health Measures Survey"; LIR, limite inferiore di riferimento; LSR, limite superiore di riferimento.  
 a) Criteri di selezione dei soggetti molto blandi.  
 b) Il dato riportato rappresenta il valore centrale della classe (ad es., 1,5 anni per la classe 1-<2 anni).

risultato che i valori ottenuti con i sistemi analitici Roche presentano un significativo scostamento negativo rispetto a quelli ottenuti con la procedura di riferimento.

In conclusione, anche se con qualche limite, riteniamo che i risultati ottenuti costituiscano un importante contributo alla definizione di IR per l'ALP sierica nella popolazione pediatrica italiana. Il fatto che i risultati siano stati ottenuti da una popolazione distribuita su buona parte del territorio nazionale, anche se con una prevalenza dell'Emilia Romagna che ha fornito ~2/3 dei dati, consente di considerare gli IR applicabili su tutto il territorio nazionale. La riferibilità metrologica dei dati ottenuti fa sì che essi possano essere usati indipendentemente dal sistema analitico impiegato nel singolo laboratorio, a patto che questo utilizzi sistemi standardizzati al sistema di riferimento (13). Gli utilizzatori dei sistemi Roche Diagnostics, fino al momento in cui il produttore non deciderà di modificare la sua calibrazione per riferirsi al sistema internazionale di riferimento, possono considerare l'opzione di "trasferire" questi IR, riducendoli del 8%. L'adozione dell'informazione da noi fornita da parte di tutti i laboratori che oggi non includono il limite inferiore di riferimento dell'intervallo pediatrico nel referto o, peggio, utilizzano come limite inferiore di riferimento quello dell'adulto, è auspicabile possa contribuire a migliorare l'individuazione o confermare il sospetto diagnostico di ipofosfatasia.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano tutti i Colleghi dei centri che hanno contribuito alla raccolta dei dati: D. Patrono (Bologna); L. Germagnoli (Castenedolo, BS); M. Boffardi (Cava dei Tirreni, NA); M. Mussap, L. Delfino, G.B. Oliveri (Genova); T. Trenti (Modena); M. Zaninotto (Padova); R. Aloe (Parma); R. Dorizzi, P. Maltoni (Pievesestina di Cesena, FC); C. Zuppi, M. Antenucci (Roma); C. Grillo, G. Mengozzi (Torino); G. Lippi, G. Salvagno, G. Brocco (Verona). Si ringraziano inoltre Valerio Vallerignani e Eva Milletti (Siena) per il supporto nell'elaborazione dei dati.

Il lavoro è stato patrocinato da SIBioC - Medicina di Laboratorio e si è avvalso di un finanziamento a SIBioC - Medicina di Laboratorio da parte della ditta Alexion.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Ceriotti F. Establishing pediatric reference intervals: A challenging task. *Clin Chem* 2012;58:808–10.
- Panteghini M, Bais R. Serum enzymes. In: Rifai N, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry & Molecular Diagnostics*, 6<sup>th</sup> ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2017.
- Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 1992;38:2486–92.
- Cattozzo G. Indagine sui metodi di determinazione e sulle modalità di refertazione dell'attività catalitica degli enzimi nel siero. *Biochim Clin* 2015;39:575–84.
- Schumann G, Klauke R, Canalias F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1439–46.
- Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem* 2012;58:854–68.
- Hoffmann H. Statistics in the practice of medicine. *J Am Med Assoc* 1963;185:864–873.
- Haeckel R, Wosniok W, Arzideh F. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1033–42.
- Kairisto V, Hänninen KP, Leino A, et al. Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:789–96.
- Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics* 1967;23:115–35.
- Concordet D, Geffré A, Braun JP, et al. A new approach for the determination of reference intervals from hospital-based data. *Clin Chim Acta* 2009;405:43–8.
- CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline - Third edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- Braga F, Frusciante E, Infusino I, et al. Valutazione dell'esattezza della misura della fosfatasi alcalina sierica in un gruppo di laboratori italiani. *Biochim Clin* 2017;41:64–71.
- Infusino I, Frusciante E, Braga F, et al. Progress and impact of enzyme measurement standardization. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:334–40.
- Cole TJ, Green PJ. Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med* 1992;11:1305–19.
- Braga F, Frusciante E, Infusino I, et al. Evaluation of the trueness of serum alkaline phosphatase measurement in a group of Italian laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:47–50.
- Zierk J, Arzideh F, Haeckel R, et al. Pediatric reference intervals for alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:102–10.
- Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009;46:8–17.
- Bianchi ML. Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. *Osteoporos Int* 2015;26:2743–57.
- Linglart A, Biosse-Duplan M. Hypophosphatasia. *Curr Osteoporos Rep* 2016;14:95–105.
- McKiernan FE, Berg RL, Fuehrer J. Clinical and radiographic findings in adults with persistent hypophosphatasemia. *J Bone Miner Res* 2014;29:1651–60.
- Adeli K, Higgins V, Nieuwesteeg M, et al. Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem* 2015;61:1049–62.
- Hilsted L, Rustad P, Aksglæde L, et al. Recommended Nordic paediatric reference intervals for 21 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;73:1–9.

24. Cho SM, Lee SG, Kim HS, et al. Establishing pediatric reference intervals for 13 biochemical analytes derived from normal subjects in a pediatric endocrinology clinic in Korea. *Clin Biochem* 2014;47:268–71.
25. Ridefelt P, Gustafsson J, Aldrimer M, et al. Alkaline phosphatase in healthy children: Reference intervals and prevalence of elevated levels. *Horm Res Paediatr* 2014;82:399–404.
26. de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Mul D. Trends in pubertal development in Europe. *Hum Reprod Update* 2001;7:287–91.
27. Tietz NW, Rinker A, Shaw L. International Federation of Clinical Chemistry. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). IFCC Document. *Clin Chim Acta* 1983;135:339F–67F.

## Le revisioni della letteratura biomedica

Valentina Pecoraro<sup>1</sup>, Giuseppe Banfi<sup>2</sup>, Paola Pezzati<sup>3</sup>, Tommaso Trenti<sup>1</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC Medicina di Laboratorio basata sull'evidenza

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

<sup>2</sup>IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

<sup>3</sup>Laboratorio Generale, Dipartimento dei Servizi, AOU Careggi, Firenze

### ABSTRACT

**The reviews of the biomedical literature.** The reviews of the biomedical literature aim to summarize and disseminate the knowledge about a specific topic intended as a disease treatment or a diagnostic biomarker. They include narrative and systematic reviews (SR). Narrative reviews simply describe the features about a specific topic. On the contrary, SR are performed to answer to a specific question by using a standardized methodology to obtain results that may be reproduced by other authors. SR may include studies of diagnostic or therapeutic efficacy and prognostic value according to the scope. SR of treatment efficacy are generally focused on the efficacy of a new treatment in comparison with the one considered as reference, commonly used in the clinical therapeutic protocols. SR focused on diagnostic test accuracy generally retrieve data on diagnostic sensitivity and specificity from original studies in order to estimate pooled likelihood ratios or predictive values. Finally, SR of prognostic studies explore the ability of a specific marker to predict the outcome of interest. A SR implies to plan a systematic literature search strategy by Medline and other biomedical databases, defining inclusion criteria for study selection. Statistical analyses allow to pool data in a meta-analysis to provide an estimates of the effect power. This paper summarize the main features of different type of SR to help readers in the comprehension of a SR and meta-analysis. Their utility in clinical practice and biomedical research is also illustrated.

### INTRODUZIONE

Le revisioni della letteratura biomedica sono articoli scientifici che raccolgono gli studi primari condotti su un argomento di interesse e dei quali sono riportati in dettaglio i principali risultati. Si distinguono in revisioni narrative e revisioni sistematiche (RS).

Le revisioni narrative sono rassegne descrittive, solitamente elaborate da esperti nel campo, che riportano gli aspetti conosciuti dell'argomento, evidenziandone punti di forza e problematiche. Sono utili per inquadrare la materia da approfondire, facili da leggere e da comprendere per coloro che non hanno conoscenze approfondite sul tema. La produzione delle revisioni narrative non segue una metodologia specifica, spesso non è riportata la strategia di ricerca, nè i criteri con i quali sono stati selezionati gli studi citati. Inoltre, le caratteristiche degli studi primari sono solitamente

descritte sommariamente e non ne viene valutata la qualità metodologica (1).

Le RS, invece, sono realizzate seguendo una metodologia rigorosa e riproducibile. Inoltre, prevedono un protocollo definito *a priori* nel quale sono descritti i criteri di inclusione degli studi (2). Sono strumenti di ricerca che si sviluppano per rispondere a un quesito clinico ben definito al fine di produrre risultati affidabili dai quali trarre conclusioni che supportino decisioni cliniche e diagnostiche (3). Le RS possono includere studi di efficacia, di accuratezza diagnostica e di prognosi. Il processo di sviluppo è comune ai 3 modelli, ma presentano caratteristiche e difficoltà diverse.

Questa rassegna ha l'obiettivo di descrivere le principali caratteristiche e le diverse tipologie di RS, per guidare i lettori nella corretta comprensione della revisione e interpretazione dei risultati.

Corrispondenza a: Valentina Pecoraro, Laboratorio Tossicologia, Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense, Via Giardini 1355, 41126 Modena. Tel. 0593961469, Fax 0593961249, E-mail: valepecoraro@gmail.com

Ricevuto: 29.07.2016

Revisionato: 15.01.2016

Accettato: 31.01.2017

Pubblicato on-line: 10.05.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.023

## LE REVISIONI SISTEMATICHE DI EFFICACIA

Le RS di studi di efficacia raccolgono in un unico documento tutte le migliori evidenze riguardo l'efficacia di un determinato trattamento (farmacologico, chirurgico, fisioterapeutico) o metodo diagnostico, seguendo una metodologia condivisa (Tabella 1).

Il percorso che porta alla realizzazione di una RS è caratterizzato da alcuni passaggi fondamentali:

- a) formulazione di un quesito clinico;
- b) ricerca di tutte le evidenze disponibili;
- c) definizione dei criteri di eleggibilità;
- d) selezione degli studi;
- e) valutazione della qualità metodologica degli studi inclusi;
- f) estrazione dei dati dagli studi inclusi;
- g) combinazione quantitativa dei dati;
- h) interpretazione dei risultati.

### Formulazione di un quesito clinico

Una RS è prodotta per rispondere a un quesito clinico ben definito e di interesse per la comunità scientifica. Per formulare una domanda in maniera corretta si ricorre all'approccio PICO, acronimo di Popolazione, Intervento, Comparatore e "Outcome". Specificare la popolazione equivale a indicare le caratteristiche dei pazienti che devono essere considerati (età, sesso, condizione di interesse). Inoltre, è necessario definire il tipo di trattamento al quale i pazienti sono sottoposti e che si vuole esaminare e indicare il trattamento messo a confronto. Infine descrivere gli esiti o "outcome" da misurare come conseguenza del trattamento valutato.

## Ricerca di tutte le evidenze disponibili

Lo sviluppo di una RS prevede la ricerca di tutti gli studi pubblicati e non pubblicati, preferibilmente senza restringere la ricerca sulla base della lingua di pubblicazione, in modo da essere sicuri di recuperare tutta la letteratura disponibile. La ricerca viene effettuata consultando più banche dati elettroniche (ad es., Medline, Embase, Scopus, Web of Science, The Cochrane Library o altri database specializzati), ma anche i registri degli studi clinici (ad es., www.clinicaltrials.gov), gli abstract dei congressi, le tesi di laurea e dottorato di ricerca e tutti i documenti che contribuiscono a formare la letteratura cosiddetta "grigia", integrando con il controllo dei riferimenti bibliografici dei singoli studi individuati e di altre RS già pubblicate.

### Definizione dei criteri di eleggibilità

I criteri di inclusione ed esclusione degli studi sono definiti *a priori*, devono riflettere il quesito della revisione e indicare il tipo di disegno di studio da includere.

### Selezione degli studi

Il processo di selezione degli studi si traduce nell'applicazione dei criteri di eleggibilità, richiede la collaborazione di almeno due revisori che concludono la selezione in maniera indipendente e deve essere chiaramente documentato.

### Valutazione della qualità metodologica degli studi inclusi

La valutazione della metodologia di uno studio primario può essere realizzata con l'ausilio di alcune

**Tabella 1**

*Principali caratteristiche e punti chiave delle revisioni sistematiche*

- Definizione del/i quesito/i della revisione
- Definizione dei criteri di eleggibilità sulla base dell'approccio PICO
- Inclusione di lavori sperimentali, esclusione di lettere, editoriali e commenti
- Selezione dei riferimenti bibliografici e degli studi da includere in base ai criteri di inclusione precedentemente stabiliti, condotta da almeno due revisori
- Descrizione delle motivazioni dell'esclusione degli studi non eleggibili
- Estrazione dei dati dagli studi inclusi seguendo uno schema di estrazione definito *a priori*
- Valutazione della qualità metodologica di ciascuno studio utilizzando strumenti appropriati
- Valutazione dell'efficacia di un trattamento confrontato con un gruppo di controllo opportuno
- Valutazione dell'accuratezza diagnostica di un esame (fornire il numero di risultati veri positivi, veri negativi, falsi positivi e falsi negativi o dati adeguati per poterli calcolare)
- Valutazione di uno o più marcatori prognostici in grado di determinare la presenza di una particolare condizione di interesse (fornire il valore di "hazard ratio" e la sua varianza o dati adeguati per poter risalire a essi)
- Combinazione dei risultati all'interno di una meta-analisi, quando possibile
- Interpretazione dei risultati sulla base dell'analisi effettuata e della valutazione della qualità metodologica degli studi inclusi

“checklist” validate e riconosciute. Le più utilizzate sono la scala di Jadad o la “risk of bias table” della “Cochrane Collaboration” (4) per gli studi randomizzati controllati e la “Newcastle Ottawa scale” per gli studi di coorte (5).

### Estrazione dei dati dagli studi inclusi

Per raccogliere le informazioni dagli studi primari sarebbe utile redigere delle schede di estrazione dedicate, nelle quali riportare tutti i dati descrittivi e numerici necessari per la sintesi qualitativa e quantitativa (analisi statistica).

### Combinazione quantitativa dei dati

I dati raccolti possono essere combinati insieme in una meta-analisi (MA) solo se sussistono adeguate condizioni ovvero quando gli studi valutano il medesimo esito in pazienti con caratteristiche simili, confrontando la stessa tipologia di intervento con un controllo adeguato. Il numero di studi minimo per effettuare una MA è 5; la numerosità degli studi è infatti un fattore che influenza l'incertezza delle stime finali.

### Interpretazione dei risultati

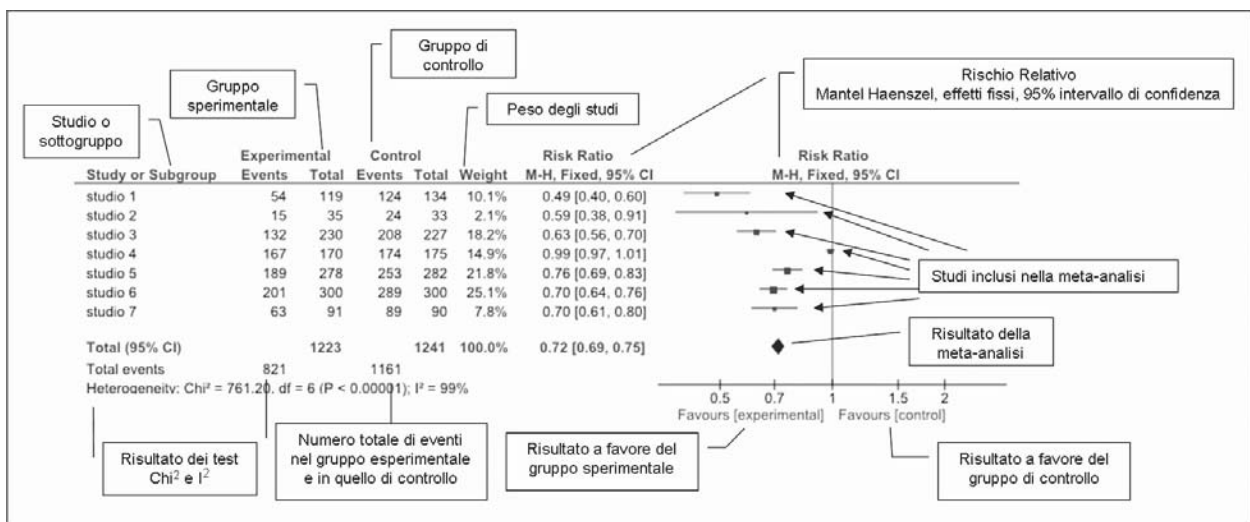
Gli autori devono spiegare i risultati ottenuti in ragione dell'analisi statistica effettuata e della valutazione metodologica.

La complessità che caratterizza lo sviluppo di una RS

richiede un'ottima conoscenza della metodologia da svolgere, la capacità di valutare criticamente (“critical appraisal”) il proprio lavoro e quello altrui e la possibilità di lavorare in un gruppo di esperti con competenze cliniche, statistiche e metodologiche diverse ma complementari tra loro.

Quando gli studi utilizzano lo stesso disegno sperimentale, includono la stessa tipologia di pazienti sottoposti al medesimo trattamento e valutano lo stesso esito (“outcome”) è possibile combinare insieme i dati numerici in una MA (6). Una RS può includere o meno una MA. La MA è il metodo statistico utilizzato per aggregare i risultati di studi indipendenti, che mira a produrre una stima unica per migliorare la precisione, aumentare la potenza statistica e investigare la consistenza o la discrepanza tra i risultati. Combinare quantitativamente i risultati dei singoli studi è il modo più efficiente per usare le informazioni che da essi derivano. Non sempre tuttavia è possibile o appropriato combinare i dati in una MA; ad esempio, quando gli studi sono diversi tra loro, quando valutano “outcome” diversi o quando gli studi sono di scarsa qualità metodologica (7).

La rappresentazione grafica degli studi combinati in una MA è il “forest plot” (Figura 1). In esso ogni studio è indicato solitamente con il nome del primo autore e l'anno di pubblicazione, il risultato è raffigurato con un quadratino la cui dimensione varia secondo il peso che ciascuno studio ha all'interno della MA, mentre l'ampiezza dell'intervallo di confidenza (CI) associato alla stima



**Figura 1**

Rappresentazione di un “forest plot” di una revisione sistematica di studi di efficacia.

Nell'esempio, la meta-analisi include 7 studi. Per ciascuno è riportato il numero di eventi (“events”) e il numero totale (“total”) dei pazienti arruolati nel gruppo sperimentale (“experimental”) e nel gruppo di controllo (“control”). Gli studi sono rappresentati da un quadratino, la cui dimensione è proporzionale al peso (“weight”) dello studio all'interno della meta-analisi. La misura di associazione utilizzata è il rischio relativo (“risk ratio”) calcolato per ciascuno studio, con il corrispondente intervallo di confidenza (CI) al 95%. Il modello statistico utilizzato è quello a effetti fissi (“fixed”). Il risultato della meta-analisi è rappresentato dal diamante in fondo alla figura, di cui è riportato anche il risultato numerico [nel caso dell'esempio, “risk ratio” (RR) 0,72; 95%CI 0,69-0,75]. Sono riportati il numero totale di eventi nel gruppo sperimentale (821) e nel gruppo di controllo (1161), oltre al numero totale di pazienti arruolati nei due gruppi (rispettivamente, 1223 e 1241). “df” indica i gradi di libertà, dato dal numero degli studi inclusi meno 1. Per ogni meta-analisi sono riportati i risultati del test  $\chi^2$  e  $I^2$  (per la spiegazione di questi ultimi, vedi testo).

puntuale è rappresentato da una linea orizzontale o "baffi" che solitamente si distribuiscono ai due lati del quadratino. Per ogni studio è riportato anche il risultato numerico. La linea verticale che attraversa la figura è la linea di non differenza. Quando il risultato di uno studio o quello della MA attraversa la linea di non differenza si conclude che il trattamento o il metodo valutato non produce alcuna variazione statisticamente significativa tra il gruppo sperimentale e il gruppo di controllo. Sopra la linea di non differenza, è indicata la misura di associazione considerata, che può essere la differenza tra le medie, il rischio relativo (RR) o l'"odds ratio" (OR), accompagnata dal CI al 95%. Nello specifico, il RR è il rapporto tra il numero di pazienti che presentano l'evento di interesse (ovvero il rischio) nel gruppo sperimentale e il rischio nel gruppo di controllo (8). OR è il rapporto tra gli "odds" tra il gruppo sperimentale e quello di controllo. L'"odds" a sua volta è il rapporto tra il numero di pazienti che presentano l'evento di interesse e il numero di pazienti che non presentano l'evento, calcolato sia nel gruppo sperimentale, sia in quello di controllo (8).

Il risultato della MA, ovvero la combinazione degli effetti stimati dagli studi inclusi, è rappresentato dal diamante posto in fondo alla figura (Figura 1).

Il grado di variabilità che esiste tra gli studi viene descritto in termini di eterogeneità e analizzato attraverso un modello statistico a effetti fissi o a effetti "random". Il modello a effetti fissi considera solo la variabilità all'interno di ciascuno studio, assumendo che gli studi utilizzino lo stesso metodo sperimentale e le caratteristiche delle popolazioni studiate siano simili, per cui i risultati ottenuti dovrebbero essere affini e le eventuali differenze dovrebbero essere dovute al solo effetto del caso. Il modello a effetti "random", invece, considera anche la variabilità esistente tra gli studi considerati, assumendo che la popolazione in esame sia un campione rappresentativo di tutti quelli possibili (4). Generalmente, quando gli studi sono eterogenei, si ricorre al modello a effetti "random". La presenza di eterogeneità tra gli studi può essere valutata visivamente osservando come gli studi si distribuiscono all'interno del "forest plot". La dimensione dell'eterogeneità viene calcolata statisticamente con il test Q di Cochran, espresso in  $\chi^2$ , e con il test di eterogeneità di Higgins ( $I^2$ ) (4). Il primo test restituisce la somma dei quadrati delle differenze tra la stima calcolata e i risultati dei singoli studi, che si considera presente con  $P < 0,05$  (8). Il secondo test descrive l'eterogeneità dei singoli studi non spiegata dal solo errore di campionamento e viene espresso in percentuale; solitamente con  $I^2 > 50\%$  l'eterogeneità è elevata e con  $I^2 > 75\%$  l'eterogeneità è sostanziale (8).

Un esempio è la RS di Cariani et al. (9), che valuta l'associazione tra la presenza dei polimorfismi dell'interleuchina 28B (rs12979860 CC e rs8099917 TT) e la risposta al trattamento con interferone e ribavirina, misurata in termini di risposta virologica sostenuta (SVR) in pazienti affetti da epatite C. Le meta-analisi indicano che entrambi i genotipi sono significativamente associati al raggiungimento della SVR, sia utilizzando un modello

statistico a effetti fissi (OR: 4,1; 95%CI: 3,7-4,5; OR: 3,7; 95%CI: 3,3-4,0), sia un modello a effetti "random" (OR: 4,1; 95%CI: 3,5-4,7; OR: 3,9; 95%CI: 3,2-4,9). I valori di OR indicano che la probabilità di raggiungere la SVR per i pazienti affetti da epatite C è ~4 volte maggiore nei pazienti con l'uno o l'altro polimorfismo considerato rispetto ai pazienti che non presentano polimorfismo (9).

La validità dei risultati di una RS dipende principalmente da due fattori: la qualità metodologica della conduzione della RS e la qualità metodologica degli studi primari inclusi. Anche se la RS è stata condotta in modo corretto, ma la qualità degli studi inclusi è discutibile, molto probabilmente i risultati saranno distorti. A sua volta, la qualità metodologica di uno studio primario è fortemente influenzata dalla qualità del "reporting".

La valutazione critica ("critical appraisal") della qualità metodologica degli studi inclusi in una RS è una componente essenziale del processo di revisione. Questa fase consiste nell'applicazione di scale di validazione ("rating") riconosciute (4, 5, 10, 11). Sono stati proposti diversi strumenti per la valutazione della qualità degli studi primari inclusi in una RS e i più utilizzati sono riportati nella Tabella 2. Il processo di valutazione tiene conto della validità interna ("efficacy") in modo da ridurre gli errori sistematici e della validità esterna ("effectiveness") ovvero la generalizzabilità dei risultati. La validità interna dipende dal disegno di studio adottato, dalla qualità della conduzione dello studio e dall'analisi eseguita. Una scarsa validità interna può dipendere dall'utilizzo di controlli inappropriati o dall'assenza di un gruppo di controllo, dalla presenza di fattori di confondimento, da un diverso intervento tra il gruppo sperimentale e il gruppo di controllo, dalla numerosità dei soggetti persi al "follow-up". La validità esterna dipende dalla rappresentatività del campione rispetto alla popolazione reale cui sarà applicato l'intervento valutato. Una scarsa validità esterna può risultare da rigidi criteri di arruolamento, da interventi troppo costosi o condotti da personale troppo specializzato (11). La valutazione della qualità metodologica degli studi deve essere presa in considerazione al momento della discussione dei risultati. Allo stesso modo è possibile valutare anche la qualità di una RS, sia la qualità della conduzione sia la qualità del "reporting" (12, 13).

## LE REVISIONI SISTEMATICHE DI ACCURATEZZA DIAGNOSTICA

Un esame viene eseguito per diagnosi, screening, prognosi o per valutare la risposta terapeutica, in modo da chiarire se un paziente è affetto o meno da una patologia e per guidare i trattamenti e le indagini diagnostiche successive (14). L'accuratezza diagnostica di un esame si riferisce alla sua capacità di distinguere i pazienti affetti e non affetti da una specifica patologia. In uno studio di accuratezza diagnostica, il risultato dell'esame che si sta valutando ("index test") è confrontato con il risultato dell'esame di riferimento

**Tabella 2**

*Strumenti per la valutazione della qualità metodologica degli studi primari e delle revisioni sistematiche*

Qualità della conduzione	Caratteristiche	Qualità del "reporting"	Caratteristiche
<i>Studi randomizzati e controllati (RCT)</i>			
Jadad scale	Analizza l'adeguatezza della randomizzazione, doppio cieco e della perdita al "follow up" associando un punteggio numerico a ogni domanda (SI=1; NO=0).	CONSORT ["Consolidated standards of reporting trial" (RCT)]	Descrive le informazioni minime che devono essere riportate in un RCT. Riporta le principali informazioni sul disegno di studio, analisi dei dati e descrizione e interpretazione dei risultati. La "checklist" comprende 22 "item" relativi a titolo, abstract, introduzione, metodi, risultati e discussione. Comprende un diagramma a flusso nel quale indicare la distribuzione dei partecipanti.
"Risk of bias"	Strumento definito dalla "Cochrane Collaboration" per valutare il rischio di "bias" in più domini.		
<i>Studi non randomizzati (studi di coorte, caso-controllo e "prima-dopo")</i>			
"Newcastle Ottawa scale"	La scala si compone di 3 domini: selezione dei gruppi, compatibilità tra i gruppi, valutazione dell'esposizione e dell'esito. Ogni dominio si compone di tre "item". I parametri di alta qualità vengono segnati con una stellina e queste sommate.	STROBE ("Strengthening the reporting of observational")	La "checklist" è costituita da 22 "item". Individua le principali informazioni che devono essere riportate in merito alla pianificazione dello studio, conduzione della ricerca, valutazione e interpretazione dei risultati ottenuti.
Criteri suggeriti dal "Cochrane Epoc Group"	Si compone di 9 domande da adattare a RCT, noRCT e studi "prima-dopo" basandosi sui suggerimenti della "Cochrane Collaboration" in merito al "risk of bias".		
<i>Studi di accuratezza diagnostica</i>			
QUADAS- 2 ("Quality assessment of diagnostic accuracy studies")	Comprende 4 domini: <ul style="list-style-type: none"> <li>• selezione dei pazienti</li> <li>• test indice</li> <li>• test di riferimento</li> <li>• "flow and timing"</li> </ul> Ogni dominio è valutato in termini di rischio di "bias" e i primi 3 sono valutati anche in termini di criticità per la loro applicabilità. Per valutare il rischio di "bias" sono inclusi 11 quesiti.	STARD "Standards for reporting of diagnostic accuracy studies"	La "checklist" è costituita da 30 "item". Indica quali sono le informazioni che devono essere riportate in uno studio di accuratezza diagnostica, in modo da migliorare la completezza e la trasparenza del "reporting" degli studi.
<i>Studi di prognosi</i>			
QUIPS ("Quality in prognosis studies")	Si compone di 4 domini : <ul style="list-style-type: none"> <li>• partecipazione allo studio</li> <li>• rappresentatività ("attrition")</li> <li>• misura dei fattori prognostici</li> <li>• misura degli esiti ("outcomes")</li> </ul> Comprende i quesiti relativi a queste aree specifiche per giudicare il rischio di "bias".	REMARK ("REporting recommendation s for tumour MARKer prognostic studies")	Linea guida per il "reporting" delle informazioni più importanti riguardo disegno di studio, ipotesi da valutare, caratteristiche dei pazienti e dei campioni, metodi di determinazione e metodi statistici. La guida fornisce anche suggerimenti riguardo quali punti valutare in discussione.
<i>Revisioni sistematiche e meta-analisi</i>			
AMSTAR ("A measurement tool to assess systematic reviews")	Costituito da 11 "item" che sottolineano tutti gli elementi che devono essere considerate nello sviluppo di una revisione sistematica.	PRISMA ("Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analysis")	Costituita da 27 "item" distribuiti in 7 domini: <ul style="list-style-type: none"> <li>• titolo</li> <li>• abstract</li> <li>• introduzione</li> <li>• metodi</li> <li>• risultati</li> <li>• discussione</li> <li>• "funding"</li> </ul>
ROBIS	Strumento per valutare il rischio di "bias" in revisioni sistematiche di efficacia, diagnosi e prognosi. È costituito da 21 quesiti distribuiti in 4 domini: <ul style="list-style-type: none"> <li>• disegno di studio e criteri di eleggibilità</li> <li>• identificazione e selezione degli studi</li> <li>• estrazione dei dati e valutazione critica degli studi</li> <li>• sintesi e risultati</li> </ul>	MOOSE ("Meta-analyses of observational studies")	Strumento per il "reporting" di meta-analisi di studi osservazionale. Comprende "item" relativi a: <ul style="list-style-type: none"> <li>• introduzione</li> <li>• strategia di ricerca</li> <li>• metodi</li> <li>• risultati</li> <li>• discussione</li> <li>• conclusioni</li> </ul> Considera la presenza di fattori confondenti.

("reference standard") determinato negli stessi pazienti. L'accuratezza è espressa attraverso la sensibilità (ovvero la proporzione di pazienti positivi sia all'"index test" sia al "reference standard") e la specificità (la proporzione di pazienti negativi all'"index test" e al "reference standard") (15, 16).

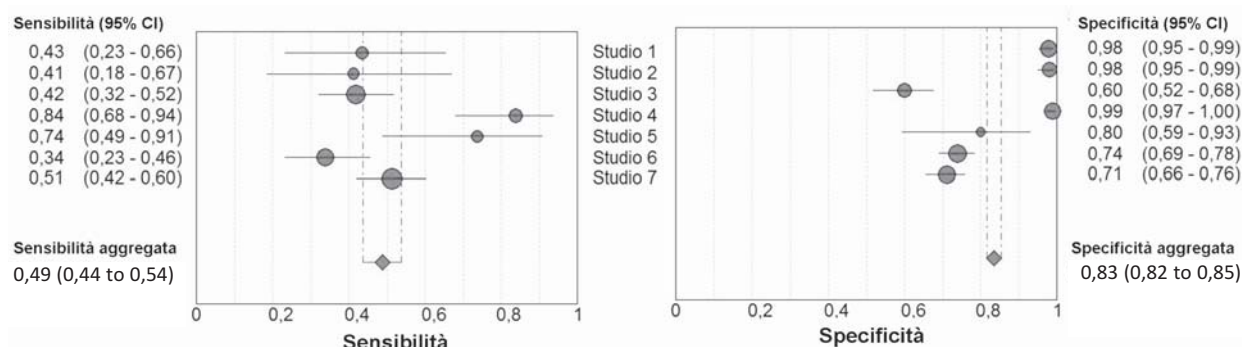
Le RS di studi di accuratezza diagnostica consentono di ottenere una stima precisa in presenza di piccoli studi che valutano lo stesso esame nella stessa tipologia di pazienti. La metodologia per sviluppare una RS di accuratezza diagnostica è la medesima degli studi di efficacia, con alcune variazioni. La prima azione è la formulazione del quesito diagnostico che guida lo sviluppo della RS. Il quesito si compone di alcuni elementi base: la popolazione sottoposta all'esame, l'esame che si vuole valutare ("index test") e quello di riferimento ("reference standard"), e la condizione o la patologia di interesse. L'identificazione degli studi risulta più complicata rispetto agli studi che valutano l'efficacia di un intervento, in quanto non esistono parole chiave o "indexing term" da utilizzare per la ricerca nei "database" elettronici. Solitamente si utilizzano tutti i sinonimi che definiscono la condizione di interesse e tutti quelli che definiscono l'esame di interesse ("index test"), con l'obiettivo di costruire una strategia di ricerca che sia più ampia possibile e quindi più sensibile (15, 16).

La valutazione della qualità metodologica dei singoli studi è necessaria per identificare le possibili fonti di distorsione o "bias" e per limitare gli effetti che queste distorsioni possono avere sulla stima e sull'interpretazione dei risultati. Lo strumento consigliato per la valutazione della qualità metodologica è il QUADAS-2 ("Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies"), una "checklist" che permette di valutare la qualità metodologica in 4 domini: pazienti, test indice, test di riferimento e tempo che intercorre tra l'esecuzione dei due test ("flow and timing") utilizzando specifici quesiti ("signalling questions"). I primi 3 domini

sono valutati anche in termini di criticità riguardo l'applicabilità (17). La selezione dei pazienti potrebbe risultare distorta quando si utilizza un disegno di studio caso-controllo o quando i pazienti per i quali la diagnosi risulta difficoltosa vengono esclusi dagli studi. Il test indice e quello di riferimento devono essere valutati in cieco, ovvero senza conoscere il risultato dell'altro esame o la diagnosi. Il risultato della MA potrebbe essere distorto se il valore di cut-off utilizzato è stato selezionato *ad hoc* o se l'esame di riferimento non classifica correttamente la condizione di interesse (17).

Gli studi di accuratezza diagnostica riportano la numerosità dei veri positivi (VP), falsi positivi (FP), veri negativi (VN) e falsi negativi (FN), i quali possono essere aggregati all'interno di una MA, che restituisce la stima media dell'accuratezza diagnostica di un esame, insieme alla misura della sua incertezza. Il risultato dei dati aggregati è espresso in termini di sensibilità, specificità, ma anche valore predittivo positivo e negativo, "likelihood ratio" positivo e negativo, e attraverso le curve ROC ("receiver operating characteristic"). Le curve ROC rappresentano graficamente l'andamento della sensibilità e specificità osservate a diversi valori di cut-off. Nelle MA rappresentano la percentuale di VP in funzione dei FP (1-specificità) di ciascuno studio considerato. Anche le MA di studi di accuratezza diagnostica sono rappresentate graficamente attraverso il "forest plot". All'interno di ciascun grafico si individua la stima di ciascun studio e i rispettivi CI definiti dalla lunghezza dei "baffi" che attraversano il grafico. Il risultato della meta-analisi è rappresentato dal diamante, corrisponde al valore di sensibilità o specificità aggregata con i rispettivi CI (Figura 2).

L'accuratezza diagnostica del (-2)proPSA è stata valutata in una recente RS che ha incluso 17 studi, in quanto le concentrazioni sieriche di questa proteina sembrerebbero più alte nei soggetti affetti da tumore alla



**Figura 2**

Rappresentazione di un "forest plot" di una revisione sistematica di accuratezza diagnostica.

La figura riporta 2 meta-analisi, una per la sensibilità e la seconda per la specificità dell'esame in valutazione. Le meta-analisi includono 7 studi primari, per ciascuno dei quali è riportato il valore di sensibilità (Se) e specificità (Sp) con i corrispondenti intervalli di confidenza (CI) al 95%, calcolati considerando i numeri dei risultati veri positivi, veri negativi, falsi positivi e falsi negativi riportati in ciascuno studio. Ogni studio è rappresentato graficamente da un cerchio. Il risultato della meta-analisi è indicato dal diamante che rappresenta la Se e la Sp aggregata, di cui è riportato anche il risultato numerico al margine della figura.

prostata che in quelli sani (18). La MA ha riportato valori di sensibilità e specificità aggregati pari, rispettivamente, al 90% e 13%, indicando che questa proteina è equivalente al PSA in termini di accuratezza diagnostica, ma il numero di biopsie non necessarie non viene ridotto in maniera significativa, così come il numero di FN rispetto allo standard di riferimento. Inoltre, l'eterogeneità tra gli studi relativa alla specificità è molto alta ( $I^2=93\%$ ), probabilmente dovuta ai diversi valori di cut-off adottati nei singoli studi. I risultati suggeriscono, quindi una limitata utilità clinica del (-2)proPSA a causa anche dell'alto tasso di FP (18).

Un fattore importante da considerare in queste MA è l'effetto soglia o effetto "threshold", che si verifica nel momento in cui studi diversi adottano valori soglia differenti. Tutti gli esami prevedono un valore soglia sotto o sopra il quale il test è considerato positivo. Se gli studi inclusi nella MA utilizzano differenti valori soglia, anche i valori di sensibilità e di specificità saranno differenti, contribuendo ad aumentare l'eterogeneità tra gli studi. Le MA di studi di accuratezza diagnostica sono in genere caratterizzate da un'alta eterogeneità, dovuta non solo all'effetto soglia, ma anche dalla condizione in cui l'esame viene eseguito e al tipo di metodo. Infatti, bisogna considerare che ogni esame è eseguito fisicamente in luoghi diversi, con metodiche differenti spesso non allineate o armonizzate e da operatori diversi, tutti fattori che contribuiscono a far accrescere l'eterogeneità (15, 16). La linea guida per la corretta esecuzione di RS di accuratezza diagnostica è la STARD ("Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy") (19).

## LE REVISIONI SISTEMATICHE DEL VALORE PROGNOSTICO

I marcatori biologici sono solitamente categorizzati in 4 gruppi in accordo al campo di applicazione: per screening, diagnostici, prognostici e di monitoraggio. Per i primi due gruppi si richiedono i dati riguardanti sensibilità e specificità, mentre i marcatori di prognosi e di monitoraggio sono valutati in base a indici di rischio, "hazard ratio" (HR), e relativa varianza in quanto sono marcatori messi in relazione con il tempo che intercorre tra la misura del marcatore e il verificarsi dell'evento avverso ("time-to-event") (20). HR indica il tasso dell'evento di interesse nel gruppo sperimentale e in quello di controllo, calcolato secondo la formula:  $HR = h_i(t)/h_c(t)$ . HR è un rapporto tra tassi medi di mortalità tra il gruppo dei trattati ( $h_i$ ) e quello di controllo ( $h_c$ ) per unità di tempo (t) (21).

Nonostante siano stati condotti molti studi che valutavano marcatori prognostici, molti non sono implementati in clinica a causa degli scarsi contenuti informativi e dei limiti metodologici che accompagnano gli studi (22).

Gli studi di prognosi analizzano delle variabili volte a predire eventi futuri e forniscono anche altre importanti informazioni per capire i meccanismi biologici e patologici della malattia, predire gli esiti nei singoli,

pianificare le terapie e definire il sottogruppo di pazienti che potrebbero trarre vantaggio da un trattamento piuttosto che da un altro (23). Le RS possono aiutare a identificare le variabili utili per la gestione dei pazienti, valutare l'utilizzo di nuovi marcatori e suddividere i pazienti in differenti gruppi prognostici per migliorare le scelte di trattamento. Ma la combinazione di tutti questi dati all'interno di una RS è difficile per tre motivi principali (23):

- 1) gli esiti di interesse sono "time-to-event", per cui le MA risultano essere difficili da eseguire;
- 2) spesso le variabili di interesse da correlare sono più di una;
- 3) per molti fattori prognostici esistono infinite modalità di analisi.

Negli studi di prognosi, i due esami devono essere somministrati contemporaneamente nella stessa coorte di pazienti e dovrebbero essere valutati e interpretati senza conoscere il risultato dell'altro esame, in modo da limitare l'effetto di possibili fattori confondenti ("confounding").

Un recente esempio è rappresentato dalla RS di Zhou et al. (24). Gli autori analizzano il ruolo prognostico della proteina C reattiva (PCR) nei pazienti affetti da tumori urologici, riportando che alti valori di PCR al basale sono associati a un minor tasso di sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma renale (HR 1,97; 95%CI: 1,6-2,4), tumore della prostata (HR 1,8; 95%CI 1,4-2,2) e della vescica (HR 2,95; 95%CI: 1,8-4,8). Gli autori concludono che elevate concentrazioni sieriche di PCR sono significativamente indicative di prognosi negativa quando la PCR sia misurata in pazienti con tumori urologici.

Per le RS di studi prognostici non esiste ancora una metodologia condivisa. Le problematiche relative a questo tipo di revisione sono dovute principalmente alla difficoltà di identificare gli studi e alla possibilità di "bias" di pubblicazione ("publication bias"), dovuto al fatto che spesso gli studi che riportano risultati negativi o non significativi non vengono pubblicati. Inoltre, la maggioranza degli studi pubblicati è di tipo retrospettivo, differiscono molto nei criteri di selezione dei pazienti e per le metodiche analitiche e statistiche utilizzate. Infine, il "reporting" delle informazioni è molto spesso inadeguato, evidenziando carenze metodologiche nel disegno e nella conduzione degli studi (23). Lo strumento per la valutazione della qualità degli studi di prognosi è il "Quality In Prognosis Studies" (QUIPS) (25). Questa "cheklist" permette di valutare la validità degli studi di prognosi in 6 domini: partecipazione, rappresentatività ("attrition"), misura dei fattori prognostici, valutazione dell'"outcome", presenza di fattori di confondimento, analisi statistica e descrizione ("reporting").

## CONCLUSIONI

Le RS sono uno strumento fondamentale nella medicina basata sulle prove di efficacia, in quanto forniscono ai professionisti sanitari informazioni affidabili

per poter prendere delle decisioni. Non sono solo riassunti di studi già pubblicati, ma veri progetti di ricerca che consentono di rispondere a uno o più quesiti clinici, diagnostici o prognostici, utilizzando una metodologia rigorosa e riproducibile. Le informazioni contenute forniscono ai clinici delle ottime basi per definire le strategie terapeutiche, offrono ai ricercatori spunti di riflessione nell'elaborazione di nuovi progetti e ai professionisti sanitari una sintesi delle conoscenze riguardo importanti patologie e la loro diagnosi. In ambito laboratoristico, MA e RS sono uno strumento fondamentale per introdurre nuovi esami e/o eliminare quelli obsoleti. Inoltre, consentono di evidenziare eventuali lacune presenti nella letteratura biomedica ancora da approfondire.

### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Snilstveit B, Oliver S, Vojtkova M. Narrative approaches to systematic review and synthesis of evidence for international development policy and practice. *Journal of Development Effectiveness* 2012;4:409-29.
- D'Amico R, Moja L, Liberati A. Le revisioni sistematiche degli studi sull'efficacia degli interventi sanitari. In: Faggiano F, Donato F, Barbone F, eds. *Manuale di epidemiologia per la sanità pubblica*. Milano: Centro Scientifico Editore, 2005:309-33.
- Chalmers A, Altman D. *Systematic review*. London: BMJ Publications, 1995.
- Higgins JPT, Green S, eds. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*, Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. <http://handbook.cochrane.org/>
- Wells G, Shea B, O'Connell D, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analysis. [www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
- Deeks J, Altman D, Bradburn M. Statistical methods for examining heterogeneity and combining results from several studies in meta-analysis. In: Egger M, Smith GD, Altman DG, eds. *Systematic reviews in health care: meta-analysis in context*. London: BMJ Publishing Group, 2008:487.
- O'Rourke K, Detsky AS. Meta-analysis in medical research: strong encouragement for higher quality in individual research efforts. *J Clin Epidemiol* 1989;42:1021-4.
- Zanolla L, Graziani MS. Glossario per il lettore di un articolo scientifico. Parte III: la meta-analisi. *Biochim Clin* 2014; 38:630-8.
- Cariani E, Roli L, Missale G, et al. Interleukin 28B polymorphisms as predictors of sustained virological response in chronic hepatitis C: systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2016;16:18-29.
- Jadad AR, McQuay HJ. Meta-analyses to evaluate analgesic interventions: a systematic qualitative review of their methodology. *J Clin Epidemiol* 1996;49:235-43.
- Chalmers T, Smith HJ, Blackburn B, et al. A method for assessing the quality of a randomized control trial. *Control Clin Trials* 1981;2:31-49.
- Schulz KF, Altman DG, Moher D, et al. CONSORT Group. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Ann Intern Med* 2010;152:726-32.
- von Elm E, Altman DG, Egger M, et al. STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Ann Intern Med* 2007;147:573-7.
- Reitsma JB, Moons KGM, Bossuyt PM, et al. Systematic reviews of studies quantifying the accuracy of diagnostic tests and markers. *Clin Chem* 2012;58:1534-45.
- Leeflang MMG, Deeks JJ, Gatsonis C, et al. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Ann Intern Med* 2008;149:889-97.
- Leeflang. Systematic reviews and meta-analyses of diagnostic test accuracy. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:105-13.
- Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 2011;155:529-36.
- Pecoraro V, Roli L, Plebani M, et al. Clinical utility of the (-2)proPSA and evaluation of the evidence: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1123-32.
- Bossuyt P, Reitsma JB, Bruns DE, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Radiology* 2015;277:826-32.
- Liu Z, Uao Z, Li C, et al. A step-by-step guide to the systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic test accuracy evaluations. *Br J Cancer* 2003;108:2299-330.
- Spruance SL, Reid JE, Grace M, et al. Hazard ratio in clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2787-92.
- Hall PA, Going JJ. Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology* 1999;35:489-94.
- Altman DG. Systematic reviews of evaluations of prognostic variables *Br Med J* 2001;323:224-8.
- Zhou L, Cai X, Liu Q, et al. Prognostic role of C-reactive protein in urological cancers: a meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:12733.
- Hayden J, van der Windt D, Cartwright J, et al. Assessing bias in studies of prognostic factors. *Ann Intern Med* 2013;158:280-6.

## Esami di laboratorio in Pronto Soccorso: una proposta di consenso SIBioC-Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care

Giuseppe Lippi<sup>1,16</sup>, Mauro Panteghini<sup>2,16</sup>, Sergio Bernardini<sup>3,16</sup>, Laura Bonfanti<sup>4,17</sup>, Paolo Carraro<sup>5,16</sup>, Ivo Casagrande<sup>6,17</sup>, Mario Cavazza<sup>7,17</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>8,16</sup>, Marcello Ciaccio<sup>9,16</sup>, Daniele Coen<sup>10,17</sup>, Davide Giavarina<sup>11,16</sup>, Fabrizio Giostra<sup>12,17</sup>, Ciro Paolillo<sup>13,17</sup>, Mario Plebani<sup>14,16</sup>, Giorgio Ricci<sup>15,17</sup>, Gianfranco Cervellin<sup>4,17</sup>

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

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi, Milano

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Divisione di Biochimica Clinica, Università di Roma Tor Vergata, Roma

<sup>4</sup>Dipartimento di Emergenza, Ospedale Universitario di Parma

<sup>5</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, ULSS3 Serenissima, Mestre-Venezia

<sup>6</sup>Dipartimento di Emergenza, Ospedale "Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

<sup>7</sup>Dipartimento di Emergenza, Ospedale Universitario "S. Orsola-Malpighi", Bologna

<sup>8</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

<sup>9</sup>Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologia Medica, Università di Palermo

<sup>10</sup>Dipartimento di Emergenza, Ospedale Metropolitano di Niguarda, Milano

<sup>11</sup>Laboratorio Analisi, Ospedale San Bortolo, Vicenza

<sup>12</sup>Dipartimento di Emergenza, ASUR Marche Area Vasta 4, Fermo (AN)

<sup>13</sup>Dipartimento di Emergenza, Ospedale Universitario di Udine

<sup>14</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università di Padova

<sup>15</sup>Dipartimento di Emergenza, Ospedale Universitario di Verona

<sup>16</sup>SIBioC - Medicina di Laboratorio

<sup>17</sup>Academy of Emergency Medicine and Care

### ABSTRACT

**Laboratory tests in the Emergency Department: a consensus document by SIBioC-Medicina di Laboratorio and the Academy of Emergency Medicine and Care.** Laboratory diagnostics in the emergency setting encompasses the identification of appropriate testing according to specific acute conditions. Since the pathway of ordering tests in the Italian Emergency Departments (EDs) is rather heterogeneous, SIBioC-Medicina di Laboratorio and the Academy of Emergency Medicine and Care designed a survey aimed to generate consensus pertaining to appropriate laboratory tests in most frequent acute conditions. A questionnaire including a panel of laboratory tests was administered to 8 representative members of each of the two societies, who were asked to provide a score between 1 and 3 for the various tests, where a score of 1 entailed "highly recommended", 2 "recommended in specific conditions" and 3 identified "highly discouraged" tests. The results of the questionnaire are shown as mean ( $\pm$ SD) of individual responses, thus allowing to define a scale of priority comprised between "highly recommended" and "highly discouraged". Overall, 24 tests were classified as "highly recommended", whereas 6 were "highly discouraged". The remaining 16 tests were classified as "somehow recommended" or "somehow discouraged". In the expectations of the two societies, this document may represent a first step towards harmonizing the laboratory test ordering in Italian EDs.

<sup>a</sup>Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica*, *Emergency Care Journal* e *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Section of Clinical Biochemistry, University Hospital of Verona, P.le LA Scuro 10, 37134 Verona. Tel. 045-8124308, E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 01.02.2017

Accettato: 08.02.2017

Pubblicato on-line: 29.03.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.014

## INTRODUZIONE

Nonostante sia ormai innegabile che gli esami di laboratorio rivestano un ruolo determinante nell'ambito del processo decisionale clinico in molti pazienti con patologie acute e croniche, l'appropriatezza prescrittiva rimane fondamentale (1). Il grande numero e la considerevole varietà di esami che sono oggi disponibili nei moderni laboratori clinici, soprattutto grazie all'automazione, può avere infatti un impatto sostanziale sull'impiego delle risorse umane ed economiche, soprattutto quando la loro prescrizione non rispetchi validi criteri basati sull'evidenza scientifica (2). In una dimensione più clinica, la prescrizione di esami inappropriati può anche generare conseguenze negative per i pazienti, poiché i cosiddetti "incidentalmi" (valori anomali rilevati per caso, in assenza di sintomi o di un fondato sospetto clinico) possono portare alla richiesta di ulteriori indagini, ingiustificate e talora invasive (3). È anche interessante notare come sia stato dimostrato che la durata media della permanenza in Pronto Soccorso (PS) aumenti di 10 min ogni 5 esami aggiuntivi prescritti al paziente e fino a 17 min per ogni 30 min di aumento del tempo di risposta ("turnaround time", TAT) (4).

Una recente indagine, estesa a un numero abbastanza elevato di laboratori italiani, ha dimostrato come la richiesta di esami in regime di urgenza/emergenza occupi una parte considerevole dell'attività di laboratorio, con percentuale media di analisi urgenti che può anche superare il 33% di tutti gli esami eseguiti (5). Ulteriori evidenze documentano che i pannelli di esami urgenti messi a disposizione dei medici di PS sono estremamente eterogenei nella loro composizione, evidenziando un contesto operativo molto poco armonizzato (6, 7). Uno studio multicentrico spagnolo, che ha coinvolto 36 ospedali, ha dimostrato che la richiesta di esami urgenti variava da 44 a 412 per 1000 pazienti ricoverati in PS (8). Lo stesso studio ha documentato che gli ospedali coinvolti avrebbero potuto risparmiare fino a un milione di esami inutili se la prescrizione degli stessi si fosse conformata a validi criteri di appropriatezza.

Il perno della diagnostica di laboratorio centrata sul paziente è rappresentato dalla selezione di un numero e di una tipologia di esami basati sull'appropriatezza prescrittiva. In aggiunta alla produzione qualche anno fa di un documento SIBioC relativo alla richiesta di esami in urgenza/emergenza (9), SIBioC e Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) hanno recentemente rilevato la necessità di raggiungere un consenso intersocietario sulla definizione di un pannello di esami richiedibili in PS, che siano quanto più possibile appropriati nell'ambito di specifiche emergenze cliniche. Il presente lavoro mostra i primi risultati ottenuti da questa attività collaborativa.

## MATERIALI E METODI

I direttivi di SIBioC e AcEMC hanno identificato 8 rappresentanti ciascuna, ai quali è stato somministrato

un questionario contenente una lista di esami richiedibili in urgenza/emergenza nell'ambito di specifici contesti clinici. Il questionario è stato inviato mediante posta elettronica ai partecipanti al sondaggio, ai quali è stato richiesto di indicare un livello di priorità (da 1 a 3: 1, "fortemente raccomandato"; 2, "raccomandato in circostanze selezionate"; 3, "fortemente sconsigliato") in relazione agli esami indicati. Veniva data anche la possibilità di aggiungere ulteriori esami ritenuti necessari per specifiche situazioni cliniche tipicamente affrontate in PS.

Le valutazioni sono state analizzate in forma di media e DS e le possibili differenze tra valutazione media SIBioC e valutazione media AcEMC sono state analizzate utilizzando il test t di Student (Analyse-it, Analyse-it Software Ltd). I parametri sono quindi stati classificati sulla base in un livello di priorità basato sulla media dei punteggi. Nello specifico, esami con media <1,5 sono stati classificati come "fortemente consigliati", media compresa tra 1,5 e <2,0 come "consigliati in circostanze selezionate", media compresa tra 2,0 e <2,5 come "tendenzialmente sconsigliati" e media  $\geq 2,5$  come "fortemente sconsigliati".

## RISULTATI

I risultati del sondaggio sono riportati nella Tabella 1, insieme al grado di raccomandazione raggiunto per consenso. 24 parametri raggiungevano un punteggio <1,5, che consentiva una classificazione in termini di "fortemente raccomandato". Per due di questi parametri [determinazione della creatinichinasi (CK) totale nel siero in soggetti traumatizzati e determinazione del D-dimero plasmatico nel sospetto di tromboembolismo venoso], la differenza di punteggio assegnata dai rappresentanti SIBioC e AcEMC è risultata significativa ( $P \leq 0,01$ ), con un grado della raccomandazione in entrambe i casi più forte da parte dei laboratoristi. Il consenso relativamente ai rimanenti parametri "fortemente raccomandati" è risultato buono.

Nel caso di 6 parametri [CK-MB e mioglobina nella diagnostica della sindrome coronarica acuta (SCA), cistatina C nella valutazione di patologie renali, lattato deidrogenasi nei traumi, presepsina nella diagnostica delle infezioni ed emoglobina glicata ( $HbA_{1c}$ ) nei soggetti diabetici] è stato raggiunto un consenso sostanzialmente soddisfacente per "fortemente sconsigliarli".

Per i rimanenti parametri indagati, il consenso come "consigliati in circostanze selezionate" riguardava 10 esami, mentre 6 esami erano "tendenzialmente sconsigliati" (Tabella 1). La significatività delle differenze nel punteggio attribuito dai rappresentanti SIBioC e AcEMC (almeno  $P \leq 0,02$ ) si sono evidenziate per l'impiego della determinazione della fibrinogenemia nei casi di emorragia e della mioglobinemia nei traumatizzati (con pareri marcatamente discordanti, "fortemente raccomandato" per i laboratoristi e "tendenzialmente sconsigliato" per i medici di medicina d'urgenza), per l'uso della determinazione dei peptidi natriuretici nel sospetto di SCA (esame in media "consigliato in

**Tabella 1**

Punteggi relativi agli esami analizzati e corrispondente raccomandazione sulla loro disponibilità in Pronto Soccorso. I valori dei punteggi sono riportati come media (DS) delle risposte

Parametro	Punteggio cumulativo	SIBioC	AcEMC	P <sup>a</sup>	Raccomandazione
<b>Anemia</b>					
Sg-Emoglobina	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
Sg-Ematocrito	1,19 (0,53)	1,00 (0)	1,38 (0,70)	0,09	<b>Fortemente raccomandato</b>
Sg-Eritrociti (RBC)	1,06 (0,24)	1,13 (0,33)	1,00 (0)	0,17	<b>Fortemente raccomandato</b>
Volume corpuscolare medio RBC	1,13 (0,33)	1,25 (0,43)	1,00 (0)	0,07	<b>Fortemente raccomandato</b>
Ampiezza di distribuzione RBC	2,00 (0,87)	2,25 (0,83)	1,75 (0,83)	0,14	Tendenzialmente sconsigliato
<b>Emorragia</b>					
Tempo di protrombina	1,06 (0,24)	1,00 (0)	1,13 (0,33)	0,17	<b>Fortemente raccomandato</b>
Tempo di tromboplastina parziale attivata	1,06 (0,24)	1,00 (0)	1,13 (0,33)	0,17	<b>Fortemente raccomandato</b>
Sg-Piastrine	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
P-Fibrinogeno	1,56 (0,50)	1,13 (0,33)	2,00 (0)	<0,001	Consigliato in circostanze selezionate
<b>Tromboembolismo venoso</b>					
P-D-dimero	1,25 (0,01)	1,00 (0)	1,50 (0,50)	0,01	<b>Fortemente raccomandato</b>
<b>Pancreatite acuta</b>					
S-Lipasi pancreatici	1,25 (0,43)	1,25 (0,43)	1,25 (0,43)	0,50	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Amilasi totale	2,50 (0,87)	2,75 (0,66)	2,25 (0,97)	0,14	Tendenzialmente sconsigliato
S-Amilasi isoenzima pancreatico	2,00 (0,71)	1,88 (0,78)	2,13 (0,60)	0,26	Tendenzialmente sconsigliato
<b>Epatite</b>					
S-Alanina amminotransferasi	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Aspartato amminotransferasi	1,81 (0,81)	2,13 (0,78)	1,50 (0,71)	0,07	Consigliato in circostanze selezionate
S-Bilirubina totale	1,25 (0,56)	1,13 (0,33)	1,38 (0,70)	0,20	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Bilirubina frazionata	1,94 (0,56)	1,88 (0,33)	2,00 (0,71)	0,34	Consigliato in circostanze selezionate
S-γ-glutamilttransferasi	2,06 (0,56)	2,25 (0,66)	1,88 (0,33)	0,10	Tendenzialmente sconsigliato
<b>Sindrome coronarica acuta</b>					
S-Troponina cardiaca I o T	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Creatinasi isoenzima MB	2,69 (0,58)	3,00 (0)	2,38 (0,70)	0,02	<u>Fortemente sconsigliato</u>
S-Mioglobina	2,94 (0,24)	2,88 (0,33)	3,00 (0)	0,17	<u>Fortemente sconsigliato</u>
S-Peptide natriuretico di tipo B (BNP o NT-proBNP)	2,25 (0,56)	1,88 (0,33)	2,63 (0,48)	<0,01	Tendenzialmente sconsigliato
<b>Patologia renale</b>					
S-Creatinina	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
Stima del filtrato glomerulare (eGFR)	1,63 (0,78)	1,50 (0,71)	1,75 (0,33)	0,28	Consigliato in circostanze selezionate
S-Urea	1,50 (0,50)	1,75 (0,43)	1,25 (0,43)	0,02	Consigliato in circostanze selezionate
S-Cistatina C	2,69 (0,46)	2,63 (0,48)	2,75 (0,43)	0,31	<u>Fortemente sconsigliato</u>
S-Gelatinasi neutrofila associata alla lipocalina	2,25 (0,66)	2,13 (0,78)	2,38 (0,48)	0,24	Tendenzialmente sconsigliato
<b>Trauma</b>					
S-Creatinasi totale	1,38 (0,60)	1,00 (0)	1,75 (0,66)	<0,01	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Creatinina	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Mioglobina	1,81 (0,81)	1,38 (0,70)	2,25 (0,66)	0,02	Consigliato in circostanze selezionate
S-Lattato deidrogenasi	2,50 (0,61)	2,38 (0,70)	2,63 (0,48)	0,22	<u>Fortemente sconsigliato</u>

**Tabella 1**  
*continua*

Parametro	Punteggio cumulativo	SIBioC	AcEMC	P <sup>a</sup>	Raccomandazione
<b>Infezione</b>					
Sg-Leucociti	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Proteina C reattiva	1,13 (0,33)	1,00 (0)	1,25 (0,43)	0,07	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Procalcitonina	1,81 (0,53)	1,63 (0,70)	2,00 (0)	0,09	Consigliato in circostanze selezionate
S-Presepsina	2,88 (0,33)	2,88 (0,33)	2,88 (0,33)	0,50	<u>Fortemente sconsigliato</u>
P-Lattato	1,19 (0,39)	1,13 (0,33)	1,25 (0,43)	0,28	<b>Fortemente raccomandato</b>
<b>Disionemia</b>					
P-Sodio	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
P-Potassio	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
P-Cloro	1,06 (0,24)	1,00 (0)	1,13 (0,33)	0,17	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Calcio totale	1,50 (0,61)	1,13 (0,33)	1,88 (0,60)	0,01	Consigliato in circostanze selezionate
Sg-Calcio libero	1,25 (0,43)	1,13 (0,33)	1,38 (0,48)	0,14	<b>Fortemente raccomandato</b>
S-Magnesio totale	1,94 (0,66)	2,13 (0,78)	1,75 (0,43)	0,14	Consigliato in circostanze selezionate
Sg-Emogasanalisi	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
<b>Diabete</b>					
P-Glucosio	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00	<b>Fortemente raccomandato</b>
P-Osmolalità	1,50 (0,61)	1,50 (0,71)	1,50 (0,50)	0,50	Consigliato in circostanze selezionate
Sg-Emoglobina glicata	2,69 (0,46)	2,88 (0,33)	2,50 (0,50)	0,06	<u>Fortemente sconsigliato</u>

<sup>a</sup>Differenza tra punteggio medio assegnato dai rappresentanti SIBioC e da quelli dell'Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC).

circostanze selezionate” dai laboratoristi e “tendenzialmente sconsigliato” per i medici di PS) e per la disponibilità del dosaggio di calcemia totale e urea (la prima “fortemente consigliata” dai laboratoristi e “consigliata in circostanze selezionate” per i rappresentanti AcEMC, mentre la situazione era esattamente all’opposto per la seconda).

Infine, altri esami sono stati indicati a vario titolo come necessari all’attività di PS da uno o più partecipanti al sondaggio. Essi includevano ammoniemia, albuminemia, formula leucocitaria e conta reticolocitaria, dosaggio di proteina C della coagulazione e antitrombina, test di Coombs indiretto, stima della cinetica di rilascio della troponina cardiaca (“ $\delta$  change”), emocoltura, ricerca del parassita malarico, ricerca di antigene di superficie (HBsAg) e anticorpi contro l’antigene del core virale (HBcAb) dell’epatite B e ormone tireotropo.

## DISCUSSIONE

Appropriatezza in medicina di laboratorio è un concetto convenzionalmente utilizzato per definire un processo che comporti un uso ottimale delle risorse umane ed economiche, volto a generare dati che siano realmente utili e informativi al fine di migliorare gli esiti,

mantenendo contestualmente un elevato livello di qualità e sicurezza (10, 11). Questa definizione è implicitamente comprensiva del fatto che il termine “inappropriatezza” non solo definisce un utilizzo eccessivo e ingiustificato di risorse, ma comprende anche il possibile sottoutilizzo di esami diagnostici, circostanza che può comportare ritardi o inefficienze nella diagnosi (12).

Salinas et al. hanno dimostrato in modo convincente che la richiesta di esami di laboratorio in condizioni di urgenza/emergenza in PS è estremamente variabile (8). Appare quindi del tutto giustificata la necessità di raggiungere un maggiore consenso di appropriatezza prescrittiva in queste situazioni cliniche. Il principale motivo che dovrebbe determinare la prescrizione di esami di laboratorio in urgenza/emergenza è la possibilità di ottenere informazioni che comportino un significativo cambiamento del ragionamento diagnostico e/o della gestione terapeutica del paziente, in associazione a un TAT efficiente, cosicché sia possibile attuare interventi clinici tempestivi ed efficaci (13). Comprensibilmente, l’inappropriatezza prescrittiva può avere un impatto negativo sull’organizzazione del laboratorio e sui pazienti. Una richiesta eccessiva di esami diagnostici può ridurre l’efficienza del laboratorio, allungando il TAT e accrescendo ingiustificatamente i costi. D’altro canto, l’esecuzione di un considerevole

numero di esami inappropriati può compromettere la capacità di analizzare rapidamente i campioni di pazienti che realmente necessitano di risultati urgenti, così come può potenzialmente generare "incidentalomi" diagnostici, cioè valori anormali ma con scarsa rilevanza clinica, che possono tuttavia promuovere la richiesta di ulteriori indagini ingiustificate, costose e talora invasive (3, 14).

In via preliminare e indipendente, sia SIBioC che AcEMC avevano già adottato nel recente passato strategie societarie volte ad accrescere l'appropriatezza prescrittiva (9, 15-17). E' nostro parere tuttavia che un approccio per migliorare l'appropriatezza prescrittiva di esami in PS si debba fondere sul raggiungimento di un consenso tra professionisti di medicina di emergenza e medicina di laboratorio, volto, se possibile, a definire un pannello standard di esami, che siano, al di là di ogni dubbio, concretamente utili e informativi in relazione a specifici contesti clinici. Queste considerazioni hanno persuaso SIBioC ed AcEMC a fondere gli sforzi per tentare di perseguire il comune obiettivo di identificare un gruppo di esami richiedibili in PS nell'ambito di specifiche condizioni cliniche. Il risultato del sondaggio, somministrato a 16 professionisti identificati dalle due società, ha consentito di ottenere un buon consenso in relazione a 24 esami classificati come "fortemente raccomandati", così come di classificarne 6 come "fortemente sconsigliati". In particolare, è interessante notare come fra questi ultimi compaiano i due marcatori CK-MB e mioglobina, da tempo considerati come obsoleti per l'impiego nei pazienti con sospetta SCA, ma ancor oggi spesso presenti nei menu delle "order entry" dei PS ospedalieri (18-21). D'altro canto, appare abbastanza scontato che esami come il dosaggio della cistatina C o della HbA<sub>1c</sub>, tipicamente non utili per evidenziare situazioni acute, sia sconsigliato. Infine, il perfetto accordo nello sconsigliare l'impiego della determinazione della presepsina appare in linea con quanto recentemente evidenziato in letteratura (22).

Per i rimanenti 16 parametri somministrati nell'indagine rimane una discreta area di incertezza, che consente ancora una certa arbitrarietà relativamente alla loro inclusione o esclusione nel gruppo di esami richiedibili in PS. E' da rilevare che almeno per alcuni di essi, l'implementazione di un approccio di "reflex testing", come per esempio già raccomandato per la determinazione dell'aspartato aminotransferasi (11, 23) o per quello della bilirubinemia coniugata (24, 25), potrebbe essere la soluzione adeguata per garantire un'appropriatezza della loro richiesta.

E' importante anche rilevare che, in aggiunta al gruppo di esami condiviso, ne esistono poi altri la cui richiesta diventa senz'altro necessaria e inevitabile in situazioni cliniche meno frequenti, ma nelle quali il laboratorio svolge un ruolo altrettanto centrale. Gli esempi riguardano l'analisi del liquido cefalorachidiano nel sospetto di meningiti, encefaliti o altre patologie acute del sistema nervoso centrale, la determinazione della gonadotropina corionica nel siero nel sospetto di gravidanza ectopica, la determinazione di vari farmaci nel sospetto di sovradosaggio (ad es., digossina, anti-

epilettici, ecc.), lo screening per intossicazione da sostanze d'abuso (incluso l'alcol) e la determinazione della carbossiemoglobina nel sospetto di intossicazione da monossido di carbonio.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Panteghini M. Appropriatezza prescrittiva ed esami di laboratorio: benvenuta l'idea ma necessita gestirla in modo più "appropriato". *Biochim Clin* 2015;39:548-50.
- Lippi G, Plebani M. Laboratory economics. Risk or opportunity? *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1701-3.
- Lippi G, Plebani M. Laboratory "incidentalomas": facts or fiction? *Eur J Intern Med* 2010;21:572.
- Li L, Georgiou A, Vecellio E, et al. The effect of laboratory testing on emergency department length of stay: a multihospital longitudinal study applying a cross-classified random-effect modeling approach. *Acad Emerg Med* 2015;22:38-46.
- Lippi G, Mattiuzzi C, Plebani M. Stat testing utilization in clinical laboratories. National survey of Italian Society of Clinical Biochemistry and Molecular Biology (SIBioC). *Clin Chem Lab Med* 2014;52:e79-84.
- Hardin E. Emergency medicine and the laboratory. *J Natl Med Assoc* 1996;88:279-82.
- Lippi G, Cervellin G, Plebani M. The ten commandments of laboratory testing for emergency physicians. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:183-7.
- Salinas M, López-Garrigós M, Uris J, et al. Differences in laboratory requesting patterns in emergency departments in Spain. *Ann Clin Biochem* 2013;50:353-9.
- Carraro P per il Gruppo di Studio SIBioC Il laboratorio nell'urgenza/emergenza. Esami di laboratorio raccomandati in alcune tipiche situazioni di Pronto Soccorso. *Biochim Clin* 2011;35:207-28.
- Giavarina D. L'appropriatezza in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:609-16.
- Ferraro S, Panteghini M. The role of laboratory in ensuring appropriate test requests. *Clin Biochem* 2017. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.03.002. Epub ahead of print.
- Lippi G, Bovo C, Ciaccio M. Inappropriateness in laboratory medicine: an elephant in the room? *Ann Transl Med* 2017;5:82.
- Smellie WS. Appropriateness of test use in pathology: a new era or reinventing the wheel? *Ann Clin Biochem* 2003;40:585-92.
- Plebani M, Lippi G. Closing the brain-to-brain loop in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1131-3.
- Cerioti F, Panteghini M. Armonizzazione in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:546-7.
- Montagnana M, Lippi G. The risks of defensive (emergency) medicine. The laboratory perspective. *Emerg Care J* 2016;12:17-9.
- Cervellin G, Cavazza M. Defensive medicine in the emergency department. The clinicians' perspective. *Emerg Care J* 2016;12:20-2.
- Plebani M, Panteghini M. Promoting clinical and laboratory interaction by harmonization. *Clin Chim Acta* 2014;432:15-21.
- Panteghini M, Belloni A, Botta M, et al. Strategie per l'impiego ottimale dei biomarcatori cardiaci: raccomandazioni e protocolli operativi. *Biochim Clin* 2005;29:419-28.

20. Valente C, Dominici R, Dolci A, et al. Valutazione dell'efficacia di raccomandazioni aziendali sulle strategie per l'impiego ottimale dei biomarcatori cardiaci ad un anno dalla loro introduzione. *Biochim Clin* 2007;31:185-90.
21. Collinson P, Hammerer-Lercher A, Suvisaari J, et al.; Working Group for Cardiac Markers, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. How well do laboratories adhere to recommended clinical guidelines for the management of myocardial infarction: The CARdiac MARker Guidelines Uptake in Europe Study (CARMAGUE). *Clin Chem* 2016;62:1264-71.
22. 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.
23. Panteghini M, Bais R. Serum enzymes. In: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5<sup>th</sup> ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012.
24. VanWagner LB, Green RM. Evaluating elevated bilirubin levels in asymptomatic adults. *JAMA* 2015;313:516-7.
25. Pasqualetti S, Szoke D, Panteghini M. Impiego dell'indice itterico come esame di primo livello per l'identificazione dei campioni con concentrazioni anormali di bilirubinemia. *Biochim Clin* 2015;39:270-4.

## Validazione per l'impiego clinico delle determinazioni di emoglobina ed ematocrito sull'emogasanalizzatore GEM Premier 4000

Elena Aloisio<sup>1,2</sup>, Andrea Panzeri<sup>2</sup>, Sarah Birindelli<sup>1</sup>, Alberto Dolci<sup>1</sup>, Mauro Panteghini<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UOC Patologia Clinica, Ospedale 'Luigi Sacco' – Polo Universitario, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano

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

Caro Editore,

L'emogasanalisi (EGA) svolge un ruolo fondamentale nella gestione dei disturbi dell'equilibrio acido-base di origine respiratoria o metabolica, in particolare nei pazienti critici (1). Essa comprende classicamente le misure su sangue intero arterioso di pH, pressione parziale dell'ossigeno (pO<sub>2</sub>), pressione parziale del diossido di carbonio (pCO<sub>2</sub>) e il calcolo della concentrazione dei bicarbonati, attraverso l'equazione di Henderson-Hasselbalch (2, 3). Con l'avvento dei moderni emogasanalizzatori, tuttavia, le determinazioni eseguite su questi strumenti sono andate ben oltre l'EGA, estendendosi alla misura degli elettroliti (sodio, potassio, cloruri), di alcuni metaboliti (acido lattico e glucosio), dell'emoglobina totale (Hb) e dell'ematocrito (Hct), oltre ai parametri specifici del modulo di CO-ossimetria (ossi-, deossi-, carbossi- e meta-emoglobina), per arrivare alla bilirubina totale e al calcio libero, oltre a un'ampia varietà di parametri derivati (3, 4). In particolare, la perfetta aderenza di questi sistemi al concetto di "point-of-care testing" (POCT) è stato il motore di questa estensione (5), che permette alle terapie intensive e ai dipartimenti di emergenza di acquisire su un singolo prelievo numerose informazioni cliniche, in alcuni casi utili tuttavia solo in ambiti specifici, come la bilirubinemia in neonatologia. Sistemi di questo genere, pur monitorando automaticamente la qualità analitica dei risultati prodotti, requisito fondamentale per l'impiego come POCT, necessitano comunque della supervisione del personale del laboratorio, in quanto nell'ambito di strutture di ricovero e cura l'installazione di strumentazione di POCT dovrebbe essere sempre eseguita "in accordo con il laboratorio che ne è unico responsabile" (6).

Recentemente, nel nostro presidio ospedaliero sono stati introdotti 5 nuovi strumenti per EGA [GEM Premier 4000, Instrumentation Laboratory (7)], due in laboratorio e uno ciascuno nei reparti di rianimazione, terapia intensiva post-operatoria e neonatologia. Prima dell'introduzione degli analizzatori in ambito clinico, è stato effettuato uno studio di confronto tra i risultati di Hb e Hct forniti dagli strumenti GEM 4000 e quelli già forniti dal laboratorio nella pratica clinica mediante contaglobuli automatico Sysmex XN-9000 (8). Il confronto, effettuato secondo il protocollo EP09-A3 del "Clinical Laboratory Standards Institute" (9), è stato eseguito per stimare la possibile esistenza di un "bias" tra le due misure di Hb e Hct e, di conseguenza, validare o meno l'utilizzo clinico dei risultati ottenuti con l'EGA POCT. In particolare, i risultati sono stati confrontati con le specifiche di qualità di livello minimo per il "bias" definite in base alla variabilità biologica dei due parametri ( $\leq \pm 2,8\%$  per Hb e  $\leq \pm 2,6\%$  per Hct), utilizzando i risultati di XN-9000 come riferimento (10).

I due analizzatori messi a confronto, GEM 4000 e XN-9000, utilizzano un metodo spettrofotometrico per la determinazione di Hb e, rispettivamente, un metodo conduttimetrico e uno impedenziometrico per la determinazione di Hct. L'emogasanalizzatore è inoltre in grado di derivare Hct dalla misura di Hb (cHct), secondo la formula:  $cHct (L/L) = 0,003 \times Hb (g/L)$ . Per lo studio erano selezionati i campioni ematici di 46 pazienti afferenti al Pronto Soccorso del nostro ospedale, ai quali erano stati contemporaneamente prelevati a scopo diagnostico due campioni di sangue intero venoso, uno in litio eparina e uno in EDTA-K<sub>2</sub>. Il residuo dei due campioni, reso preventivamente anonimo, è stato poi analizzato in doppio, rispettivamente il sangue in litio eparina su GEM 4000 e quello in EDTA sul contaglobuli XN-9000. Le concentrazioni di Hb e Hct ottenute variavano, rispettivamente, da 56,0 a 175,5 g/L e da 0,16 a 0,53 L/L (dati XN-9000). I grafici di correlazione con le rispettive equazioni di regressione lineare e quelli delle differenze tra metodi sono mostrati nella Figura 1. Il "bias" medio per la misura della Hb su GEM 4000 risultava pari a +3,4% [intervallo di confidenza al 95% (CI): 2,6-4,3], lievemente più elevato rispetto all'obiettivo analitico minimo (+2,8%). L'analisi della regressione evidenziava trattarsi di uno scostamento sistematico costante di ~4 g/L (Figura 1A), dato del tutto simile a

Corrispondenza a: Elena Aloisio, UOC Patologia Clinica, Ospedale "Luigi Sacco", Via GB Grassi 74, 20157 Milano. Tel. 0250319848, Fax 0239042896, E-mail elena.aloisio@unimi.it

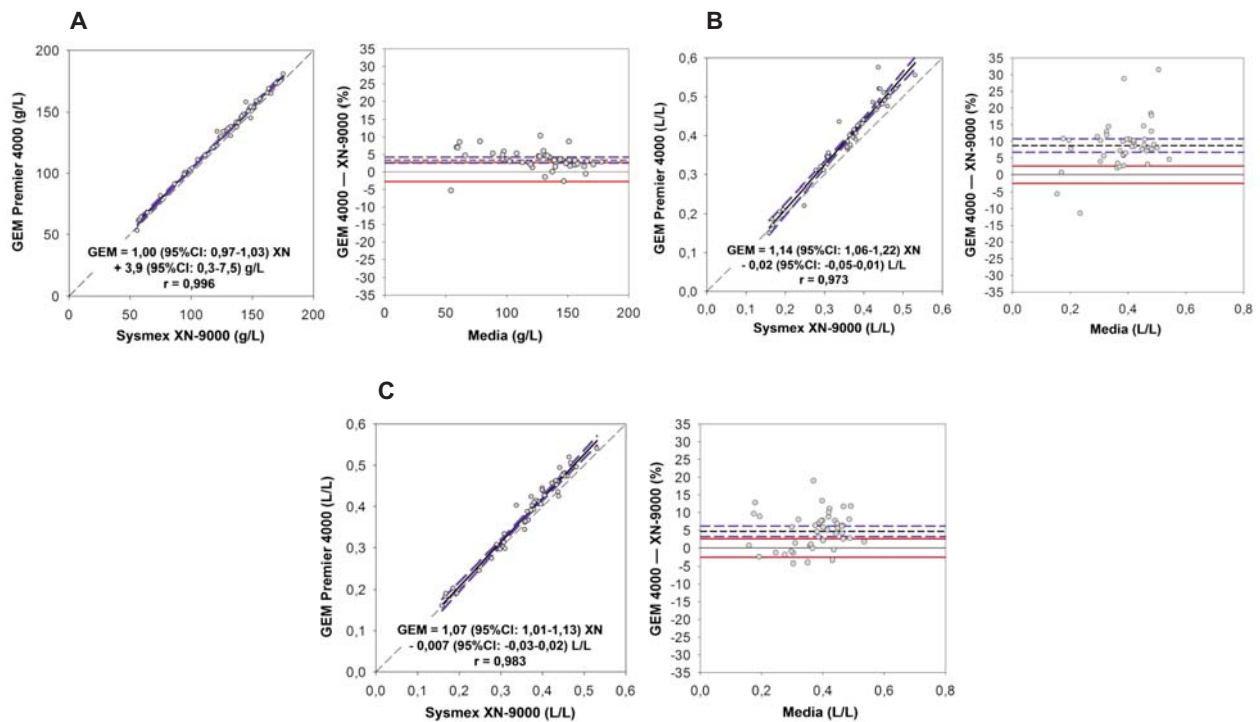
Ricevuto: 21.12.2016

Revisionato: 11.01.2017

Accettato: 13.01.2017

Pubblicato on-line: 13.04.2017

DOI: 10.19186/BC\_2017.015



**Figura 1**

Risultati di emoglobina (A), ematocrito misurato (B) ed ematocrito calcolato (C) ottenuti con strumentazione GEM 4000 confrontati con quelli dell'analizzatore Sysmex XN-9000. Nei grafici di regressione, l'intervallo di confidenza al 95% della retta è indicato dalle linee blu tratteggiate, mentre la linea tratteggiata nera indica la retta  $y=x$ . Nei grafici delle differenze, la linea nera tratteggiata indica il "bias" percentuale medio, le linee blu il suo intervallo di confidenza al 95% e le linee rosse continue i limiti del "bias" accettabile.

quelli precedentemente pubblicati da altri autori (4, 7). Al contrario, l'entità del "bias" per Hct misurato su GEM (+8,7%, CI: 6,7-10,8) si dimostrava troppo marcata per consentire un impiego clinico di questa misura. Il "bias" osservato si dimezzava impiegando cHct, passando a +4,7% (CI: 3,2-6,2), ma rimanendo sempre di tipo proporzionale (Figura 1C). I risultati della comparazione eseguita con cHct erano certamente migliori (il coefficiente di regressione andava da 0,973 a 0,983), anche se, in termini di esattezza, non raggiungevano comunque il traguardo minimo di qualità ( $\pm 2,6\%$ ).

In conclusione, mentre il "bias" evidenziato nella determinazione di Hb su GEM 4000 si può considerare tollerabile per gli scopi clinici per i quali questo risultato dovrebbe essere utilizzato (inquadramento rapido di quadri acuti per valutare il grado di anemia del paziente in ambito di emergenza/urgenza), per Hct misurato e, in minor entità, calcolato su GEM 4000 la sovrastima dimostrata appare non accettabile per un impiego clinico di questa determinazione. Questi risultati suggeriscono comunque che, in generale, queste determinazioni sugli emogasanalizzatori non dovrebbero essere utilizzate come pratica elettiva, ma dovrebbero essere riservate esclusivamente per propositi di screening in casi di estrema urgenza, dove anche l'attesa di 10-20 min aggiuntivi per ricevere i risultati di un esame emocromocitometrico eseguito dal laboratorio centrale potrebbe dimostrarsi non tollerabile per il trattamento del paziente. In tutti gli altri casi, la determinazione di Hb e Hct dovrebbe essere richiesta al laboratorio, in grado di fornire risultati accurati in un tempo totale di analisi del tutto compatibile con le esigenze cliniche della grande maggioranza dei pazienti (11).

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

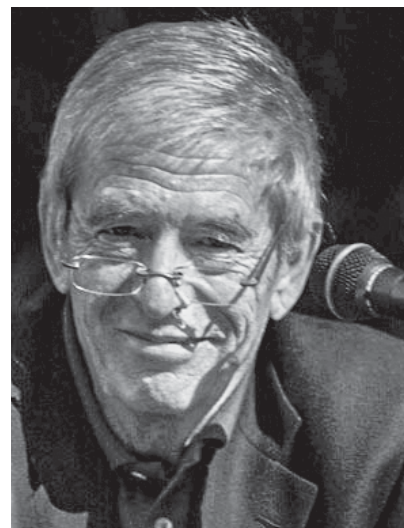
## BIBLIOGRAFIA

1. Kelly AM. Can VBG analysis replace ABG analysis in emergency care? *Emerg Med J* 2016;33:152-4.
2. Byrne AL, Bennett M, Chatterji R, et al. Peripheral venous and arterial blood gas analysis in adults: are they comparable? A systematic review and meta-analysis. *Respirology* 2014;19:168-75.
3. CLSI. Blood gas and pH analysis and related measurements: Approved guideline – 2<sup>nd</sup> ed. CLSI Document C46-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
4. De Koninck AS, De Decker K, Van Bocxlaer J, et al. Analytical performance evaluation of four cartridge-type blood gas

- analyzers. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1083-91.
5. Leino A, Kurvinen K. Interchangeability of blood gas, electrolyte and metabolite results measured with point-of-care, blood gas and core laboratory analyzers. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1187-91.
  6. Regione Lombardia. Decreto 252 del 21 Gennaio 2013 "Indicazioni in merito alle attività dei servizi di medicina di laboratorio riguardo le attività di POCT (Point of Care Testing)". <http://www.promozionesalute.regione.lombardia.it/shared/ccurl/925/463/Decreto%20252%20del%2021%20genn%202013%20POCT.PDF>
  7. Beneteau-Burnat B, Pernet P, Pilon A, et al. Evaluation of the GEM Premier 4000: a compact blood gas CO-oximeter and electrolyte analyzer for point-of-care and laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:271-9.
  8. Birindelli S, Carnevale A, Aloisio E, et al. Valutazione dell'imprecisione dell'esame emocromocitometrico eseguito con analizzatore Sysmex XN-9000. *Biochim Clin* 2016;40:166-8.
  9. CLSI. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples: Approved guideline – 3<sup>rd</sup> ed. CLSI Document EP09-A3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
  10. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
  11. Dolci A, Giavarina D, Pasqualetti S, et al. Total laboratory automation: do stat tests still matter? *Clin Biochem* 2017. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.04.002.

## In ricordo di un grande Amico e Maestro

Ho conosciuto Carlo Franzini nel lontano 1963, anno della mia laurea e di inizio della mia attività professionale. Carlo è stato il mio primo Maestro: ho lavorato sotto la Sua guida per 4 bellissimi anni, appassionandomi alla Medicina di Laboratorio sia sotto gli aspetti di servizio che della ricerca scientifica. Carlo, infatti, pur trovandosi a operare allora in un ospedale di provincia, non rinunciava mai alla passione per la ricerca, cosa che aveva fatto di Lui uno studente esemplare e un brillante ricercatore alla Scuola Normale di Pisa. In quegli anni di sviluppo, veramente esplosivo, della Biochimica Clinica e delle strutture di laboratorio ospedaliere, Carlo dedicò la sua già solidissima preparazione in Biochimica e in Patologia Generale allo sviluppo scientifico e professionale della nostra disciplina, basata sulla strutturazione di moderni e autonomi servizi di laboratorio per la cura del paziente e sull'inserimento della disciplina stessa nei percorsi formativi universitari e post-laurea. Io debbo a lui (e anche al compianto Prof. Norberto Montalbetti, anch'egli operante in quegli anni nello stesso ospedale) il mio primo approccio alla Biochimica Clinica.



Carlo si impose ben presto all'attenzione della comunità scientifico-professionale italiana e internazionale. Pur senza ricordare tutte le tappe della sua brillante carriera, desidero sottolineare l'importante contributo dato dal Prof. Franzini alla fondazione della SIBioC e al suo rapido affermarsi come associazione scientifica italiana interdisciplinare di grande livello e con grandi ambizioni internazionali. La sua Presidenza SIBioC, così come quella del Congresso Europeo a Milano nel 1989, e la sua attivissima presenza nei comitati scientifici del Congresso IFCC a Firenze nel 1999 e del Congresso Europeo di Milano del 2013 sono state tappe fondamentali nella vita della SIBioC. Tra i settori di grande e originale competenza del Prof. Franzini è doveroso ricordare quello della qualità in laboratorio, dei materiali e metodi di riferimento, dei valori di riferimento e dell'interpretazione dei risultati di laboratorio, settori di grande valore non solo sul piano sanitario ma anche sociale.

Sul piano umano, Carlo era una persona veramente eccezionale. Dotato di una straordinaria intelligenza, affrontava le difficoltà della vita e del lavoro con grande impegno, ma anche con un naturale senso di leggerezza e una sottile ironia, mai disgiunte da un grande rigore morale e intellettuale. Molto attento ai rapporti umani, sempre pronto alla battuta, ispirava a tutti grande simpatia. Aveva a volte un atteggiamento a prima vista un po' ombroso, dietro al quale si nascondeva qualche preoccupazione o amarezza, non sempre facili da interpretare, ma era sempre sorretto da un grande senso di responsabilità e rispetto per le opinioni altrui. Era severo nei giudizi e piuttosto selettivo nei rapporti umani, ma di animo sempre molto generoso e pronto ad aiutarti e insegnarti, senza fartelo mai pesare.

Fin dagli anni della nostra prima collaborazione, è nata tra noi una grande amicizia, durata per tutta la vita. Perdo con lui un grande Amico e Maestro.

Pierangelo Bonini

## Prof. Carlo Franzini (1934-2017)

Carlo Franzini è stato tra i soci fondatori di SIBioC: assieme a Giulio Vanzetti e Giovanni Ceriotti partecipò, infatti, nel luglio 1969 alla riunione a Cortina d'Ampezzo con l'allora Presidente IFCC Martin Rubin, dove si posero le basi per la fondazione della nostra Società. Ha partecipato attivamente alla vita societaria: componente del Consiglio Direttivo negli anni 1972-74, 1983-86, 1994-96, 1998-2000, viene eletto Presidente per due volte, la prima nel biennio 1983-84 e la seconda nel 1999. Inoltre, per 15 anni (1991-2006) dirige la rivista *Biochimica Clinica*, organo ufficiale della SIBioC.

Laureatosi in Medicina e Chirurgia a Pisa nel 1958, si specializza in Ematologia Clinica e di Laboratorio nel 1962 e in Anatomia e Istologia Patologica e Tecniche di Laboratorio nel 1965. Nei primi anni '60 incontra il Prof. Giovanni Ceriotti, con il quale apprende le metodologie di valutazione del DNA. Dal 1959 al 1968 lavora presso il laboratorio dell'ospedale di Gallarate (VA), prima come assistente e poi come aiuto, e nel 1968 diventa primario di laboratorio a Vigevano (PV). Nel 1970 si trasferisce all'Ospedale Del Ponte di Varese, dove rimane per 17 anni. Poi opera per 5 anni all'ospedale di Rho, fino al 1992, anno in cui assume la direzione del Laboratorio dell'Ospedale 'Luigi Sacco' di Milano, dove rimane fino al termine della sua carriera professionale nel 2004.

Sul versante accademico, dal 1995 è Professore Associato di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università Statale di Milano, divenendo nel 2000 Ordinario di Biochimica Clinica nella stessa Facoltà. Dal 2001 al 2007 dirige la Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica della stessa Università.

Carlo Franzini ha rappresentato SIBioC e la Medicina di Laboratorio italiana a livello internazionale, facendo parte dell'Executive Board della Divisione Scientifica IFCC dal 1988 al 1992 e di quello della Divisione Pubblicazioni IFCC dal 1993 al 1997, coprendo anche il ruolo di Editor dei documenti IFCC.

È stato presidente del Congresso EuroMedLab, tenutosi a Milano nel 1989, primo grande evento internazionale di Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio tenutosi in Italia, evento che ha definitivamente consacrato SIBioC sulla scena internazionale. A livello europeo, ha anche svolto il ruolo di Segretario della FESCC (Forum of the European Societies of Clinical Chemistry, antesignana dell'attuale EFLM) negli anni 1996-1999.

## In ricordo di Silvana Penco

Ci ha recentemente lasciato la Dr.ssa Silvana Penco. Laureatasi in Scienze Biologiche nel 1989 presso l'Università di Genova, consegue successivamente il Dottorato di Ricerca in "Biologia umana: basi cellulari e basi molecolari" (1994) e il Diploma di Specializzazione in Genetica Medica (1998). Effettua inoltre esperienze di ricerca scientifica all'estero, presso l'Istituto di Chimica Biologica della Facoltà di Medicina di Strasburgo (Francia) e il Department of Human Genetics, Roche Molecular System, di Alameda, California. Nel 2000 inizia la sua attività di genetista presso il Servizio di Genetica Medica dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano, di cui diventa responsabile nel 2012. Nello stesso anno entra a far parte, in qualità di referente per la genetica delle malattie rare, del gruppo Malattie Rare dello stesso ospedale, coordinato dalla dott.ssa De Juli. Nel corso della sua carriera ha contribuito alla stesura di vari Piani di Diagnosi e Cura per la sclerosi laterale miotofica, l'angioma cavernoso, l'albinismo e nel campo delle dislipidemie. Presso l'ospedale Niguarda ha coordinato l'attività di genetica medica molecolare e di consulenza genetica, mediante un approccio multidisciplinare per le malattie neurogenetiche con neurologi, neuroradiologi, neurochirurghi e psicologi. Intensa è stata la sua attività di docenza, sia in lauree di I livello che presso Scuole di Specializzazione e la Scuola di Formazione Permanente di SIBioC. La sua attività scientifica ha visto la produzione di oltre 100 pubblicazioni apparse su riviste internazionali di prestigio.



La ricordiamo sempre in prima linea, disponibile e dal tratto umano attento e comprensivo, in special modo con i pazienti afferenti al suo laboratorio. Ha rappresentato una figura importante, partecipativa e innovativa nel panorama della ricerca genetica italiana e internazionale. Persona dall'entusiasmo contagioso, insostituibile punto di riferimento professionale, sempre disponibile a intraprendere nuovi progetti con passione e curiosità.

Andrea Mosca

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

Alessandro Marocchi

Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano



# FORMAZIONE A DISTANZA

## SIBioC PROVIDER



### *Nuovo corso FAD:*

#### **Appropriatezza prescrittiva nell'Ambulatorio del Medico di Medicina Generale**

#### **Richiesta ed interpretazione degli Esami di Laboratorio**

Coordinatori: Maria Stella Graziani, Marcello Ciaccio, Bruna Lo Sasso

**15 crediti ECM**

#### **Obiettivi del corso**

Il corso consentirà ai **professionisti di Laboratorio** di acquisire informazioni utili all'attività di consulenza che sono chiamati a fornire in merito all'appropriata prescrizione degli esami e alla loro corretta interpretazione.

Il **Medico di Medicina Generale** acquisirà informazioni relative all'appropriatezza prescrittiva degli esami di Laboratorio nei diversi scenari clinici (diagnosi, monitoraggio, risposta alla terapia) di numerose patologie. Verranno inoltre fornite indicazioni che siano di ausilio alla corretta interpretazione dei risultati degli esami di Laboratorio.

#### **Altri corsi attivi:**

#### ▶ **Teoria e pratica dell'Evidence Based Laboratory Medicine**

Coordinatore: Tommaso Trenti

**15 crediti ECM**

#### ▶ **Corso introduttivo all'emogasanalisi: aspetti analitici, algoritmi diagnostici e casi clinici**

Coordinatori: Erica Rampoldi, Pietro Caironi

**8 crediti ECM**

#### ▶ **Casi clinici 2: il contributo della medicina di laboratorio**

Coordinatori: Mariastella Graziani, Cosimo Ottomano

**10 crediti ECM**

#### ▶ **La malattia renale cronica: clinica e laboratorio**

Coordinatore: Mariastella Graziani

**8 crediti ECM**

Per visionare l'offerta formativa SIBioC completa seguici su [www.sibioc.it](http://www.sibioc.it)



Consulta il  
Catalogo editoriale...



Cosa c'è  
di nuovo in Libreria?

QUALE CENTRO CONVEGNI A MILANO FA AL MIO CASO?

## BioMedia Centro Convegni

BioMedia dispone di sale idonee per  
convegni, **meeting**, **workshop**,  
incontri **one to one**, corsi di **formazione** e **residenziali**.

BioMedia mette a disposizione **sale riunioni attrezzate**, che possono essere utilizzate per poche ore o per intere giornate. Sono ideali per presentazioni, conferenze, piccole e grandi riunioni, colloqui di selezione, convegni, corsi di formazione e possono essere allestite con tavolo riunioni, a ferro di cavallo, a platea, a banchi, a showroom.

La struttura è dotata di tutte le **migliori tecnologie multimediali**, che consentono video-registrazioni professionali anche per **corsi a distanza (FAD)**.

A vostra disposizione troverete sempre la cortesia del nostro **staff** per l'accoglienza dei vostri ospiti.

Avrete la location ideale per dare valore a ogni vostro incontro, breve o lungo, pubblico o riservato che sia.

La sala principale può ospitare fino a 80 persone ed è modulabile secondo le esigenze dei clienti.

Il centro dispone inoltre di una ulteriore sala da 20 persone destinata all'area catering.

I clienti possono inoltre richiedere i seguenti servizi aggiuntivi:

- ▶ receptionist dalle ore 8:00 alle 21:00
- ▶ segreteria in sala per tutta la durata della riunione
- ▶ registrazione della riunione e stesura resoconto
- ▶ gestione inviti ai partecipanti
- ▶ gestione viaggio e soggiorno dei partecipanti
- ▶ servizi transfer
- ▶ servizio di traduzione simultanea
- ▶ organizzazione coffee break e colazioni di lavoro
- ▶ assistenza tecnica
- ▶ servizi editoriali
- ▶ programma sociale e per accompagnatori

Contatta il nostro referente che ti seguirà passo a passo nell'organizzazione dell'evento presso la nostra struttura:

Silvia Terragni  
Telefono: 02 45498282  
E-mail: [convegni@biomedia.net](mailto:convegni@biomedia.net)

# 49<sup>o</sup> Congresso Nazionale SIBioC-Medicina di Laboratorio

Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

Save the date



**Medicina di Laboratorio e Clinica: tra presente e futuro**

*Laboratory Medicine and Clinical Practice: from present to the future*



**FIRENZE**  
**16-18 ottobre 2017**

un evento  
organizzato da



**BIO MEDIA**  
La condivisione del sapere

[www.congresso.sibioc.it](http://www.congresso.sibioc.it)