
BC

biochimica clinica

In questo numero:

**EPIGENETICA:
Diabete mellito di tipo 1**

vedi pag. 97

Allergia al latte vaccino

vedi pag. 103

DOCUMENTO SIBioC: la gestione dei valori critici

vedi pag. 167



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

**RAGGIUNGETE UNA INTEGRAZIONE
DI LABORATORIO SENZA PRECEDENTI
CON ALINITY – LA NOSTRA NUOVA
FAMIGLIA DI SISTEMI ARMONIZZATI**



Alinity è la soluzione totale di sistemi di nuova generazione, progettati per semplificare le vostre attività e fornirvi un livello di integrazione senza precedenti in tutte le discipline del laboratorio.

Alinity ci, la famiglia di sistemi integrati per immunometria e chimica clinica, ha la capacità di trasformare il vostro laboratorio in un modello di efficienza e prestazioni, aiutando voi e la vostra struttura a raggiungere prestazioni sanitarie significativamente migliori.

Per maggiori informazioni visitate Alinity.com, inviate una email a wired@abbott.com o chiedete al vostro Ambassador.



CHOOSE TRANSFORMATION

sommario



EDITORIALE

93

Comunicare i risultati critici: raccomandazioni e stato-dell'arte
M. Plebani

95

Procalcitonina: una palestra metodologica
P. Pezzati, M.S. Graziani

RASSEGNE

97

Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1
M. Montagnana, G. Lippi, E. Danese

103

Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino
F.D.E. De Palma, L. Paparo, R. Nocerino, R. Berni Canani, F. Salvatore, V. D'Argenio

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

112

Cinnamaldehyde and cinnamic acid from cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) increase the binding of glucose to human albumin
R. Abou-Khalil, R. Bou-Absy, S. Doumit, J. Bitar, R. Nasser, E. Khoury

119

Indagine conoscitiva congiunta SIBioC-Medicina di Laboratorio e Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO) relativa alla gestione del processo diagnostico del liquido pleurico
S. Buoro, P. Pezzati, P.A. Canessa, S. Gasparini, G. Bernardi, M. Seghezzi, M. Ciaccio, G. Lippi

131

La check list in medicina di laboratorio quale strumento di assicurazione della qualità e sicurezza del paziente: l'esempio del prelievo venoso
A. Aita, R. Marin, C. Pozzato, E. Piva, L. Sciacovelli, M. Plebani

141

La gestione del rischio clinico in medicina di laboratorio: risultati del questionario congiunto SIBioC-Medicina di Laboratorio e Società Italiana di Ergonomia (SIE) inviato ai laboratori della Regione Toscana
C. Scapellato, F. Balboni, M. Quercioli, P. Pezzati, G. Toccafondi, P. Casprini, A. Aita, R. Guerranti, M. Fiorini, G. Fuzzi, A. Tomei, R. Tartaglia

OPINIONI

146

La procalcitonina in terapia intensiva: dubbi che rimangono?
R.M. Dorizzi, A.M. Azzini, P. Sette

152

L'analisi dello stato di instabilità dei microsattelliti per la diagnosi e la terapia dei tumori correlati alla sindrome di Lynch
F. Duraturo, P. Izzo

DOCUMENTI

155

Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio
Documento congiunto del Gruppo di Studio Biomarcatori Cardiovascolari di SIBioC-Medicina di Laboratorio ed European Ligand Assay Society (ELAS)
A. Clerico, M. Zaninotto, S. Masotti, V. Musetti, C. Prontera, A. Ripoli, M. Mion, C. Passino, M. Plebani

DOCUMENTI SIBioC

167

Raccomandazioni per l'identificazione e la gestione dei risultati critici nei laboratori clinici
E. Piva, F. Balboni, G. Banfi, G. Bonetti, M. Daves, A. Dolci, D. Farci Santarcangeli, G. Lima-Oliveira, G. Lippi, M. Locatelli, V. Miconi, M. Montagnana, M. Morandini, P. Pezzati, M. Quercioli, R. Tartaglia, G.L. Salvagno, G. Toccafondi, D. Giavarina per Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIPMeL "Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio", per Gruppo di Studio SIBioC "Rischio clinico" e per Società Italiana di Ergonomia e fattori umani (SIE)

LETTERE ALL'EDITORE

180

Procalcitonina in terapia intensiva: più certezze che dubbi
G. Lippi, C. Mattiuzzi

sommario

CASI CLINICI

e15

La misura delle catene leggere libere identifica la ricaduta di malattia e orienta per una rivalutazione della tipizzazione dell'amiloide in una paziente con amiloidosi AL
P. Milani, M. Basset, F. Russo, M. Nuvolone, F. Lavatelli, T. Bosoni, L. Pirolini, F. Li Bergolis, A. Foli, R. Albertini, G. Palladini, G. Merlini

e18

Un caso di anemia multifattoriale
F. Tosato, E. Piva, A. Schiavinato, M. Plebani

e22

La misura delle catene leggere libere nel liquor nella diagnosi della sclerosi multipla
D. Lopergolo, D. Scribano, M.T. Dell'Abate, C. Zuppi, A. Urbani, T. De Michele

e26

Un liquor particolarmente informativo
G. Del Mese, P. Nannini, G. Zuin, M. Mastrangelo, G.V. Zuccotti, F. Fontana, E. Corsini, G. Bernardi

e29

Una proteinuria sottovalutata
A. Gubbiotti, L. Rosengart, A. Malgrande, G. Piccone

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

Mario Plebani

Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

La comunicazione tempestiva e accurata dell'informazione di laboratorio è importante quanto la qualità analitica dei risultati, e lo è tanto più nel caso di risultati anormali. Quest'affermazione, che sembra ovvia e immediatamente condivisibile, in realtà, non trova pratica applicazione nella realtà clinica, né ha raggiunto un livello di armonizzazione nei singoli Paesi e fra Paesi diversi.

Le evidenze sono molteplici: a fronte di una mole di lavori e di conferenze di consenso per stabilire gli obiettivi analitici, sono ancora carenti le specifiche di prestazione nelle fasi extra-analitiche, e in particolare nella fase post-analitica; la letteratura clinica, molto più di quella laboratoristica evidenzia il problema degli errori/ritardi nella presa in carico e interpretazione del referto di laboratorio (1); la difficoltà nel controllare l'effettiva e accurata presa in carico dell'informazione di laboratorio, la tendenza a focalizzarsi su indicatori di efficienza produttiva interna al laboratorio e il consolidamento delle strutture - spesso situate al di fuori delle realtà assistenziali - hanno ancor più diminuito l'attenzione sulla qualità post-analitica.

Eppure, non è un caso che chi ha descritto in modo magistrale il ciclo dell'esame di laboratorio rappresentandolo nel concetto del "brain-to-brain-loop" – ciclo che si completa solamente quando viene intrapresa un'azione clinica sulla base dell'informazione di laboratorio – è lo stesso ricercatore che ha definito come valore critico o di panico un risultato che sottende un rischio immediato per la vita del paziente e che richiede un tempestivo intervento terapeutico correttivo (2).

Particolarmente per questi risultati, quindi, il legame fra produzione e comunicazione del risultato diviene un unicum, ossia non è distinguibile la differenza fra qualità analitica del risultato e sua comunicazione accurata e tempestiva.

Il documento "Raccomandazioni per l'identificazione e la gestione dei risultati critici nei laboratori clinici" pubblicato in questo numero della rivista è particolarmente importante per varie ragioni (3).

In primis, chiarisce il concetto di risultati critici sottolineando la differenza da quello di esami critici,

individuando le responsabilità dei professionisti di laboratorio e dei clinici che, solamente quando si integrano, possono assicurare la miglior qualità di cura al paziente.

In secondo luogo, evidenzia la necessità – sancita anche dal documento di accreditamento ISO 15189 – che ogni laboratorio sviluppi e adotti una procedura efficiente per la comunicazione dei valori/resultati critici e che tale procedura sia inserita nell'ambito di un sistema qualità volto a prevenire il rischio clinico, migliorare la sicurezza per i pazienti e ridurre l'errore in medicina.

In terzo luogo, e nell'ambito del grande progetto di armonizzazione in medicina di laboratorio, il documento chiarisce che la lista degli esami che possono determinare risultati critici è legata alla tipologia e complessità delle patologie e dei pazienti che si rivolgono a un particolare laboratorio clinico. Viceversa, i limiti critici dei misurandi devono trovare un'armonizzazione, anche se possono essere differenziati a seconda delle fasce di età (età pediatrica e adulta in particolare) o di altre condizioni.

Infine, il documento riassume in modo chiaro gli elementi essenziali e caratterizzanti la comunicazione dei risultati critici, sia nel caso di comunicazione verbale che telematica.

Lo sforzo degli autori di riassumere in un documento sufficientemente snello e chiaro le prove della letteratura, le differenze esistenti nella pratica clinica e i pochi dati sul rapporto fra comunicazione dei risultati critici ed esiti clinici ("outcomes") va premiato, anche se mi è doveroso segnalare la tendenza – tipica dei risultati delle meta-analisi e delle raccomandazioni – a omogeneizzare verso il basso le esperienze di eccellenza e i risultati ottenuti.

Di certo, la comunicazione verbale dei risultati è una pratica non solo costosa in termini di tempo e risorse umane, ma è soprattutto pericolosa perché legata alla soggettività delle persone e del momento. Il punto di svolta del passaggio alla comunicazione telematica con la sicurezza dell'avvenuta risposta da parte del ricevente e la documentazione dell'intero processo nel sistema informatico non può essere disconosciuto, così come

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Giustiniani 2, 35121 Padova. Tel. 0498212792, Fax 049663240, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 12.03.2018

Revisionato: 12.03.2018

Accettato: 12.03.2018

Pubblicato on-line: 14.03.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.017

non può essere disconosciuta la pericolosità di affidare la comunicazione a call centers esterni alla professione (4, 5).

Inoltre, ridurre a una frase le prove che la comunicazione dei risultati critici è inattesa nel 50% dei casi di un ospedale-universitario e che in oltre il 65% dei casi porta a modificare sostanzialmente la gestione clinica del paziente (diagnosi/terapia) appare sinceramente punitivo per chi ha condotto queste esperienze, a dispetto dei tanti che non producono dati perché non hanno attivato modalità corrette di comunicazione dei risultati critici e la valutazione di questa importante pratica (6).

Se, a distanza di 4 decenni dalla definizione del concetto di risultato critico, la letteratura e la pratica sono ancora scarsamente rappresentative dell'importanza del tema e delle possibili ricadute negative sulla qualità di cura di una mancanza/difettosità delle procedure di definizione e comunicazione dei risultati critici, penso che la professione debba ripensare a quale sia la missione del laboratorio clinico e del singolo professionista e che sia da promuovere con convinzione l'introduzione della qualità della comunicazione dei risultati critici fra gli indicatori di qualità che ogni laboratorio dovrebbe adottare (7).

A prescindere da queste riflessioni, il documento va visto come un momento importante per ribadire il ruolo centrale della medicina di laboratorio nell'assicurare un'elevata qualità di cura e migliorare la sicurezza per i pazienti. Le raccomandazioni sono sicuramente applicabili a tutti i laboratori clinici che vogliono interpretare la missione in senso globale e centrato sui bisogni del paziente ("end-to-end service") e

sottolineano l'importanza di mantenere una corretta focalizzazione su tutte le fasi del ciclo dell'esame di laboratorio. In particolare, ripropongono con forza l'importanza della comunicazione, elemento strategico in medicina come pure nell'ambito allargato a tutte le attività dell'uomo in questo preciso momento storico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem* 2010;47:101-10.
2. Lundberg GD. When to panic over abnormal values. *Med Lab Obs* 1972;4:47-54.
3. Piva E, Balboni F, Banfi G, et al. Raccomandazioni per l'identificazione e la gestione dei risultati critici nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2018;42:167-79.
4. Piva E, Sciacovelli L, Zaninotto M, et al. Evaluation of effectiveness of a computerized notification system for reporting critical values. *Am J Clin Pathol* 2009;131:432-41.
5. Piva E, Plebani M, Doering TA, et al. Laboratory critical values should support effective clinical decision making. *Am J Clin Pathol* 2016;145:142-3.
6. Piva E, Pelloso M, Penello L, et al. Laboratory critical values: automated notification supports effective clinical decision making. *Clin Biochem* 2014;47:1163-8.
7. Piva E, Sciacovelli L, Pelloso M, et al. Performance specifications of critical results management. *Clin Biochem* 2017;50:617-21.

Procalcitonina: una palestra metodologica

Paola Pezzati¹, Maria Stella Graziani²

¹Centro Regionale di Riferimento, Struttura Organizzativa Dipartimentale Sicurezza e Qualità in Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

²Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

Questo numero della rivista ospita un interessante confronto tra professionisti relativo al valore della misurazione della procalcitonina in vari scenari clinici. Gli ambiti della discussione sono quelli quotidiani e fondamentali per la nostra professione: appropriatezza della richiesta, miglior utilizzo delle risorse ed impatto sull'outcome. Gli strumenti utilizzati per formulare le indicazioni sono quelli dell'Evidence Based Medicine (EBM): raccolta delle evidenze, valutazione di qualità e forza delle raccomandazioni e infine contestualizzazione. Sebbene il quadro di riferimento sia consolidato e ampiamente condiviso, i contributi presentati da Dorizzi e Lippi (1-2), unitamente al documento societario sull'argomento già pubblicato (3), mostrano che esistono spazi per un confronto dialettico.

Quest'ultimo è particolarmente prezioso in ambito scientifico, in quanto aiuta a esplicitare la caleidoscopica molteplicità dei quesiti clinici presenti nella così detta vita reale. Il paradigma della medicina della complessità, concetto particolarmente utilizzato in geriatria e che ben descrive molte delle situazioni che la sanità attuale deve affrontare, consiste nel cercare di decodificare gli elementi della complessità senza perdere la ricchezza dell'insieme (4). La medicina di laboratorio è a pieno titolo implicata in queste operazioni di definizione degli elementi di base (caratteristiche analitiche del test) e di ricomposizione del quadro di insieme (impatto sull'outcome clinico, rapporto costo-beneficio) e i contributi presenti in questo numero devono essere letti anche in questa ottica.

La garbata contrapposizione di vedute dei due Autori (1-2) ha come parole chiave Dubbi e Certezze: più dubbi per il primo e più certezze per il secondo, relativamente all'utilizzo della determinazione della procalcitonina nella "stewardship" antibiotica. Si potrebbero citare molti esempi conflittuali simili: particolarmente sconcertante il caso, nell'ambito delle terapie per la riduzione del rischio cardiovascolare, commentato su JAMA (5), del test genomico che individua pazienti non metabolizzatori del Clopidogrel da pro farmaco a farmaco, test ritenuto doveroso da alcuni Autori e da non utilizzare da altri.

La domanda che necessita di una risposta è dunque se esistano strumenti per far sì che la comunità scientifica non si trasformi in una sorta di agone in cui i professionisti si debbano misurare a colpi di evidenze.

La risposta potrebbe, ancora una volta, venire dalla EBM, che nei suoi percorsi evolutivi ha creato strumenti metodologicamente sofisticati per rispondere pragmaticamente alla complessità dei quesiti, in modo trasparente, controllabile, esplicito e riproducibile.

Il metodo GRADE, specificamente adattato al test diagnostico (6) si focalizza sulla valutazione dell'impatto del test su outcome importanti per il paziente e propone un approccio strutturato denominato "the GRADE evidence to decision [EtD] frameworks" per la valutazione della certezza delle evidenze relative agli effetti sugli interventi clinici. I professionisti hanno quindi una traccia strutturata per formalizzare le proprie valutazioni, ovvero per esprimere i propri dubbi e certezze in modo razionale, trasparente e quantificabile.

E' innegabile che il metodo GRADE sia complesso, ma attualmente rappresenta la metodologia con la quale confrontarsi, per lo sviluppo di modelli decisionali.

Biochimica Clinica ha ospitato contributi ed editoriali sull'utilizzo della procalcitonina nel 2004 (7), nel 2013 (8-9) e quest'anno (1-3), ovvero con una cadenza di circa sette anni. Sarà molto interessante vedere quali discussioni saranno in grado di stimolare i contributi del 2025.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Dorizzi R, Azzini AM, Sette P. La procalcitonina in terapia intensiva: dubbi che rimangono? *Biochim Clin* 2018;42:146-51.
2. Lippi G, Mattiuzzi C. La procalcitonina in terapia intensiva: più certezze che dubbi. *Biochim Clin* 2018;42:180-2.
3. Lippi G, Montagnana M, Balboni F, et al. Documento di

Corrispondenza a: Paola Pezzati, Centro Regionale di Riferimento, S.O.D. Sicurezza e Qualità in Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Largo Brambilla 3, 50134 Firenze. Tel. 0557949971, Fax 0557947714, E-mail pezzatip@aou-careggi.toscana.it

Ricevuto: 11.04.2018

Revisionato: 12.04.2018

Accettato: 12.04.2018

Publicato on-line: 23.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.026

- consenso SIBioC-Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) sull'utilizzo in Pronto Soccorso dei biomarcatori per la diagnosi di sepsi batterica. *Biochim Clin* 2018;42:62-73.
4. Gensini GF, Fabbri LM, Fini M, et al. La medicina della complessità: BPCO e comorbidità. Firenze University Press, 2010. <http://www.fupress.com/Archivio/pdf/4564.pdf> (Ultimo accesso: aprile 2018).
 5. Nissen SE Pharmacogenomics and clopidogrel: irrational exuberance? *JAMA* 2011;306:2727-8
 6. Trenti T, Schüneman HJ, Plebani M. Developing GRADE outcome-based recommendations about diagnostic tests: a key role in laboratory medicine policies. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:535-43.
 7. Merlotti C, Luraschi P. Procalcitonina: aspetti biochimici, metabolici, clinici, analitici. *Biochim Clin* 2004;28:257-67.
 8. Panteghini M. Procalcitonina: tra evidenze e criticità. *Biochim Clin* 2013;37:12-4
 9. Pezzati P, Balboni F, Piazzini T, et al. Procalcitonina e sepsi: alcuni aspetti relativi all'appropriatezza della richiesta. *Biochim Clin* 2013;37:15-22

Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1

Martina Montagnana, Giuseppe Lippi, Elisa Danese

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

ABSTRACT

Epigenetics in Type 1 Diabetes Mellitus. Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a chronic autoimmune illness characterized by insufficient production of insulin by pancreatic beta cells. This condition occurs by environmental disruption (mostly supported by viral infections or nutritional components) of immune tolerance in genetically susceptible individuals. The lack of concordance in monozygotic twins for common diseases as T1DM has led to hypothesize that epigenetics may have a pivotal role in the pathogenesis of this condition, by modulating the relationship between the genotype and the phenotype. Epigenetics is commonly defined as the regulation of gene expression through chemical changes including DNA methylation or histone modulation of noncoding RNAs, without directly involving mutational changes in DNA. Epigenetics has recently contributed to amplify our understanding of the mechanisms underlying different pathological conditions for which causes other than genetic mutations and environmental factors are involved. Epigenetic modification in T1DM may hence mediate the environmental influence on expression of genes involved in the pathogenesis of disease. Therefore, this review is focused on describing the leading epigenetic mechanisms participating to the pathogenesis and progression of T1DM, and discussing the diagnostic or prognostic role of some potentially useful epigenetic biomarkers.

INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito tipo 1 (DMT1) è una patologia che insorge prevalentemente in età pediatrica ed è caratterizzata dalla progressiva diminuzione del numero di cellule β pancreatiche secernenti insulina (1, 2).

Negli ultimi decenni, soprattutto nei paesi del Nord-Europa, si è assistito a un aumento dell'incidenza (3), con incrementi annui del 2,4%, 2,6%, e 3,3% in Finlandia, Germania e Norvegia, rispettivamente (4, 5).

Il DMT1 è una malattia complessa, la cui eziopatogenesi va ricercata nell'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali (6). Studi condotti su gemelli monozigoti, che condividono pertanto il medesimo patrimonio genetico, hanno consentito di concludere con certezza che il fatto di possedere lo stesso DNA e di essere esposti alle stesse condizioni ambientali non sono sufficienti a determinare una concordanza completa di malattia. In particolare, la concordanza risulta inferiore al 50% per gemelli monozigoti a rischio di DMT1 (7-9).

Diversi autori hanno ipotizzato che il divario esistente tra genetica e ambiente possa essere attribuito, almeno in parte, a meccanismi epigenetici (10-13). Secondo

questa teoria, le modificazioni epigenetiche indotte da fattori ambientali (quali stress, farmaci, invecchiamento, agenti infettivi, ma anche esercizio fisico, abitudini alimentari e microbiota intestinale) sarebbero in grado di modulare l'espressione di geni coinvolti nella patogenesi del diabete (10) (Figura 1). Sarebbe quindi verosimile concludere che siano proprio alcuni pattern di espressione epigenetica a giustificare le differenze riscontrate tra individui con il medesimo corredo genetico.

MECCANISMI EPIGENETICI

L'epigenetica (dal greco *επί*, *epì* = "sopra" e *γεννητικός*, *gennetikòs* = "relativo all'eredità familiare") è convenzionalmente definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili nell'espressione genica non causati da cambiamenti nella sequenza del DNA (14). Più poeticamente, l'epigenoma può essere definito come la "sinfonia che risuona nelle nostre cellule" (15). Le cellule utilizzano lo stesso DNA in modo eterogeneo, così come un'orchestra può suonare lo stesso spartito in tanti modi diversi.

I meccanismi epigenetici che entrano in gioco

Corrispondenza a: Martina Montagnana, Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, P.le Scuro 10, 37134 Verona. Tel. 0458126880, Fax 0458027484; E-mail martina.montagnana@univr.it

Ricevuto: 04.01.2018

Revisionato: 07.02.2018

Accettato: 07.02.2018

Publicato on-line: 15.02.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.013

essenziali di questi RNA non codificanti è testimoniata dal fatto che le loro sequenze appaiono altamente conservate anche in organismi filogeneticamente molto lontani tra loro (26).

È stato, ad esempio, dimostrato che i miRNA regolano più del 60% dei geni codificanti proteine (27). Poiché la regolazione avviene in modo molto dettagliato, anche piccole differenze nell'espressione dei miRNA possono associarsi allo sviluppo di patologie autoimmuni, cardiovascolari o predisporre all'insorgenza di neoplasie (28).

I miRNA, nella loro forma matura, possono essere rilasciati in circolo all'interno di microvescicole, in esosomi, legati a proteine trasportatrici, alle lipoproteine ad alta densità (HDL) o in corpi apoptotici, e possono funzionare come messaggeri cellulari (29). Essi possono quindi essere considerati biomarcatori ideali, poiché estremamente stabili, non subendo processi di degradazione ad opera delle ribonucleasi endogene (30, 31). Assume poi maggior rilievo il fatto che i miRNA mantengono la loro stabilità anche dopo trattamento a elevate temperature, congelamento prolungato, processi di congelamento-scongelo e condizioni estreme di pH (32, 33).

EPIGENETICA NEL DIABETE MELLITO TIPO 1

I considerevoli progressi tecnologici compiuti nel corso degli ultimi anni hanno consentito di pianificare studi denominati "Epigenome-wide Association Studies" (EWAS), focalizzati sullo studio della metilazione di molti siti distribuiti lungo tutto il genoma, così da poter costruire dei veri e propri profili di metilazione (34).

Nel 2011, conducendo un EWAS nei monociti CD14+ isolati da 14 coppie di gemelli monozigoti discordanti per la diagnosi di DMT1, Rakan e collaboratori hanno identificato 132 siti CpG (Citosina-fosfato-Guanina) su un totale di 27.458 isole CpG studiate, con un diverso grado di metilazione tale da consentire di differenziare soggetti già diabetici da quelli ancora sani (35). Di conseguenza, molti geni coinvolti nella patogenesi del DMT1, quali *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1* e *GAD2*, appaiono ipo- o iper-metilati nei pazienti diabetici rispetto ai controlli ancora sani. Un altro dato molto interessante è che queste differenze di metilazione possono precedere di molti anni l'insorgenza del diabete (35).

Un anno dopo la pubblicazione dello studio di Rakan, Fradin e colleghi hanno analizzato i livelli di metilazione dei siti CpG situati nella regione promoter del gene dell'insulina in 485 diabetici e 317 controlli, dimostrando che alcune isole (CpG -19, -135 e -234) appaiono ipo-metilate e altre iper-metilate (CpG -180) nei pazienti diabetici rispetto ai controlli (36). Inoltre, confrontando i profili di metilazione dei soggetti con DMT1 o DMT2, i profili di metilazione sono apparsi considerevolmente differenti (36).

In uno studio successivo, un altro gruppo di ricerca ha identificato 88 siti con stati di metilazione significativamente diversa mediante analisi dello stato di metilazione di 27.578 isole CpG in 9 coppie di gemelli

monoigoti (3 discordanti e 6 concordanti per DMT1). Questi siti si trovano in prevalenza nelle regioni promotrici di geni con un ruolo ben definito nella patogenesi della malattia, quali *HLA*, *INS*, *IL2Rb* e *CD226.91* (37).

Studi condotti sulle cellule β pancreatiche hanno poi consentito di dimostrare che queste cellule presentano una frequenza più elevata di siti CpG non metilati nel gene della pre-proinsulina rispetto ad altre cellule (38). Inoltre, i livelli di DNA non metilato nel sangue periferico sono apparsi più elevati nei pazienti con DMT1 rispetto ai controlli (39, 40).

In uno studio molto recente, infine, si è potuto dimostrare che l'ipo-metilazione nel gene *RFL1* nel sangue periferico dei pazienti con diagnosi di DMT1 è già presente nelle primissime fasi della malattia (41).

Oltre che nella patogenesi del DMT1, studi recenti hanno rivelato che la presenza di variazioni nello stato di metilazione del DNA possono associarsi allo sviluppo delle più frequenti complicanze diabetiche (42) quali nefropatia (43, 44), retinopatia (45) e complicanze vascolari (46), aprendo così importanti prospettive per l'utilizzo dell'epigenetica nella definizione del rischio a medio-lungo termine dei pazienti.

Per quanto riguarda le modificazioni post-traduzionali degli istoni associate a geni coinvolti nella patogenesi del DMT1, i risultati di uno studio pubblicato nel 2008 hanno dimostrato come l'iperglicemia possa condizionare il grado di modificazioni post-traduzionali di alcuni istoni chiave (H3K9Ac, H3K9me2, H3K9me3 e H3K9me1), localizzati in prossimità di regioni promotrici di geni implicati nella patogenesi del DMT1 (47). Questi dati confermano quelli ottenuti da uno studio precedente, in cui l'espressione della deacetilasi istonica è apparsa inferiore nelle cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti diabetici rispetto ai controlli (48).

Il grado di acetilazione dell'istone 4 è anche apparso più elevato in pazienti con DMT1 senza complicanze vascolari, il che consentirebbe di attribuire all'acetilazione istonica un ruolo protettivo contro il danno vascolare (49).

Uno studio successivo ha dimostrato che il grado di acetilazione dell'istone H3K9, associato alle regioni a monte dei geni *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*, era maggiore in pazienti con DMT1 rispetto ai controlli sani (50). Un ulteriore studio da cui sono stati ottenuti risultati molto interessanti ha coinvolto 60 pazienti dello studio "Diabetes Control and Complications Trial-Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications" (DCCT-EDIC). Metà dei pazienti aveva un buon controllo metabolico (concentrazione media di HbA1c <56 mmol/mol, assenza di progressione di retinopatia o nefropatia diabetica), mentre la restante metà aveva un cattivo controllo metabolico (concentrazione media di HbA1c >76 mmol/mol, progressione di retinopatia o nefropatia diabetica) (51). L'analisi del grado di metilazione e acetilazione di alcuni istoni nei due gruppi di pazienti ha consentito di dimostrare sostanziali differenze in alcune modificazioni post-traduzionali. In particolare, il grado di acetilazione della lisina 9

dell'istone 3 (H3K9Ac) è apparso correlare significativamente con la concentrazione di HbA1c nei soggetti con cattivo controllo metabolico. Questo riscontro sembrerebbe quindi fornire una sorta di giustificazione epigenetica alla memoria metabolica del diabetico (51).

Vari studi, anche molto recenti, hanno consentito di sottolineare il ruolo dei miRNA nella patogenesi del DMT1, il loro potenziale utilizzo come biomarcatori circolanti diagnostici e prognostici, e anche come target terapeutici (52-54).

In studi condotti su modelli murini si è potuto dimostrare che la delezione completa di *dicer-1* (enzima essenziale per il processo di maturazione dei miRNA nel citoplasma cellulare) porta a morte del topo, mentre la delezione pancreas-specifica dell'enzima si associa a un ipo-sviluppo pancreatico e a un alterato rapporto tra cellule α e β nelle isole del Langherans (55). Alla riduzione numerica delle cellule β e all'aumento di quelle α consegue un aumento di glucagone e una diminuzione dei livelli di insulina, con conseguente sviluppo della patologia diabetica.

Il mir-375, uno dei miRNA maggiormente studiati in letteratura, è coinvolto sia nello sviluppo del pancreas che nella regolazione della secrezione di insulina (56-58). Topi con delezione di mir-375 ottenuta sperimentalmente, sviluppano iperglicemia, con bassi livelli di insulina ed elevate concentrazioni di glucagone, sia a digiuno sia dopo carico glicemico (57). In uno studio successivo condotto su 22 bambini con DMT1 all'esordio e 10 controlli non diabetici, i livelli di espressione di mir-375 sono apparsi più bassi nei pazienti rispetto ai controlli (59).

Molti studi hanno identificato altri miRNA circolanti che possono essere potenzialmente utili come biomarcatori di DMT1. Tra questi miR-25-3p, i cui livelli circolanti sierici sono apparsi aumentati nei pazienti con DMT1 (60), o miR-21a e miR-93, la cui espressione è diminuita nelle cellule mononucleate circolanti dei pazienti diabetici (61).

Recentemente, Garcia-Contreras e collaboratori hanno condotto uno studio su 12 pazienti con DMT1 e 12 controlli (62). I livelli di espressione di un pannello di 800 miRNA sono stati analizzati negli esosomi plasmatici, vescicole lipidiche del diametro di 30–200 nm rilasciate da tutti i tipi di cellule tra cui anche le cellule β pancreatiche (63). Dopo aver identificato 7 miRNA con diverso grado di espressione nei pazienti diabetici rispetto ai controlli, uno dei quali sovra-regolato (miR-25-3p) e 6 sotto-regolati (miR-16, miR-302d-3p, miR-378e, miR-570-3p, miR-574-5p, miR-579), gli stessi miRNA sono stati rianalizzati con metodo "Real-Time Quantitative Reverse Transcription" PCR (qRT-PCR) in una popolazione di 24 pazienti con DMT1 e 24 controlli. I livelli di espressione di miR-16-5p, miR-574-5p e miR-302d-3p si sono confermati più bassi nei pazienti rispetto ai controlli anche in questa seconda popolazione (62).

È stato inoltre dimostrato che il livello di espressione di alcuni miRNA può correlare con l'andamento della malattia, ad esempio con la funzione residua delle

β cellule pancreatiche o con la progressione delle complicanze (64). Sebastiani e collaboratori hanno osservato un incremento di livelli di miR-326 nei linfociti di sangue periferico di pazienti diabetici, che appariva peraltro correlarsi con il grado di compromissione delle isole pancreatiche (65). Infine, un ridotto livello di espressione di miR-574 plasmatico è stato associato con il rischio di sviluppare nefropatia diabetica (66).

CONCLUSIONI

L'espressione dei miRNA è stata largamente studiata in passato al fine di comprendere a fondo la patogenesi del DMT1. Nell'ultimo decennio gli studi di epigenetica si sono prevalentemente focalizzati nell'identificazione di possibili biomarcatori diagnostici circolanti, mentre l'obiettivo più ambizioso per il futuro è di basarsi sull'epigenetica per identificare validi bersagli terapeutici.

Studi condotti su modelli cellulari e murini hanno consentito di verificare il potenziale utilizzo a scopo terapeutico degli anti-miRNA antisense inhibitors (AMO), oligonucleotidi anti-miRNA di sintesi che bloccano i miRNA poiché perfettamente complementari ai precursori e ai miRNA maturi. L'incubazione di una linea cellulare d'insulinoma (INS-1E) con l'oligonucleotide 2'-O-methyl-miR-375 ha determinato un aumento dell'espressione del target genico *PDK1*, contestuale a un ripristino della normale produzione di insulina (67). In un modello animale di topo obeso, l'inibizione di miR-103 e miR-107 mediante utilizzo di 2'-O-methyl-miR-103 e -107 ha determinato un sensibile miglioramento dell'omeostasi glucidica e della sensibilità all'insulina (68).

In conclusione, malgrado persistano ancora problemi irrisolti legati alle tecniche di analisi e alla loro standardizzazione (69), i recenti sviluppi delle conoscenze e della strumentazione consentono di catalogare l'epigenetica come un campo in rapida evoluzione, auspicabilmente in grado di impattare favorevolmente sulla diagnosi, prognosi e terapia di molte patologie, tra le quali indubbiamente anche il DMT1.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010;464:1293-300.
2. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014;383:69-82.
3. Dabelea D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. *Lancet* 2009;373:1999-2000.
4. Thunander M, Petersson C, Jonzon K, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82:247-55.

5. Ehehalt S, Dietz K, Willasch AM, et al. Prediction model for the incidence and prevalence of type 1 diabetes in childhood and adolescence: evidence for a cohort-dependent increase within the next two decades in Germany. *Pediatr Diabetes* 2012;13:15-20.
6. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, et al. Genetics of type 1 diabetes. What's next? *Diabetes* 2010;59:1561-71.
7. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, et al. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 2008;359:2849-50.
8. Knip M. Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. *Horm Res Paediatr* 2011;76(Suppl. 1):57-64.
9. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 1992;35:1060-7.
10. Litherland SA. Immunopathogenic interaction of environmental triggers and genetic susceptibility in diabetes. Is epigenetics the missing link? *Diabetes* 2008;57:3184-6.
11. Stankov K, Benc D, Draskovic D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. *Pediatrics* 2013;132:1112-22.
12. Wang Z, Xie Z, Lu Q, et al. Beyond genetics: what causes type 1 diabetes. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;52:273-86.
13. Jerram ST, Dang MN, Leslie RD. The role of epigenetics in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2017;17:89.
14. Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr* 2007;27:363-88.
15. Smith K. Epigenome: The symphony in your cells. <http://www.nature.com/news/epigenome-the-symphony-in-your-cells-1.16955> (ultimo accesso: Dicembre 2017).
16. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:596-612.
17. Foley DL, Craig JM, Morley R, et al. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol* 2009;169:389-400.
18. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006;31:89-97.
19. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, et al. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 2002;111:115-27.
20. Talens RP, Christensen K, Putter H, et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 2012;11:694-703.
21. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10604-9.
22. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41-5.
23. Smith E, Shilatifard A. The chromatin signaling pathway. Diverse mechanisms of recruitment of histone-modifying enzymes and varied biological outcomes. *Mol Cell* 2010;40:689-701.
24. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;107:823-6.
25. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
26. Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, et al. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Res* 2013;23:34-45.
27. Bajan S, Hutvagner G. Regulation of miRNA processing and miRNA mediated gene repression in cancer. *Microna* 2014;3:10-7.
28. Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett* 2011;585:2087-99.
29. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 2012;37:460-5.
30. Matsuzaki J, Ochiya T. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review. *Int J Clin Oncol* 2017;22:413-20.
31. Larrea E, Sole C, Manterola L, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci* 2016;17.
32. Mraz M, Malinova K, Mayer J, et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:1-4.
33. Bonfrate L, Altomare DF, Di Lena M, et al. MicroRNA in colorectal cancer: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment. *J Gastrointest Liver Dis* 2013;22:311-20.
34. Birney E, Smith GD, Grealley JM. Epigenome-wide Association Studies and the Interpretation of Disease - Omics. *PLoS Genet* 2016;12:e1006105.
35. Rakyan VK, Beyan H, Down TA, et al. Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genet* 2011;7:e1002300.
36. Fradin D, Le Fur S, Mille C, et al. Association of the CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. *PLoS One* 2012;7:e36278.
37. Stefan M, Zhang W, Concepcion E, et al. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J Autoimmun* 2014;50:33e37.
38. Husseiny MI, Kuroda A, Kaye AN, Nair I, et al. Development of a quantitative methylation-specific polymerase chain reaction method for monitoring beta cell death in type 1 diabetes. *PLoS One* 2012;7:e47942.
39. Fisher MM, Watkins RA, Blum J, et al. Elevations in circulating methylated and unmethylated preproinsulin DNA in new-onset type 1 diabetes. *Diabetes* 2015;64:3867-72.
40. Akirav EM, Lebastchi J, Galvan EM, et al. Detection of beta cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:19018-23.
41. Belot M-P, Nadéri K, Mille C, et al. Role of DNA methylation at the placental RTL1 gene locus in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2017;18:178-87.
42. Intine RV, Sarras MP Jr. Metabolic memory and chronic diabetes complications: potential role for epigenetic mechanisms. *Curr Diab Rep* 2012;12:551-9.
43. Brennan EP, Ehrlich M, O'Donovan H, et al. DNA methylation profiling in cell models of diabetic nephropathy. *Epigenetics* 2010;5:396-401.
44. Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK, et al. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genomics* 2010;3:33.
45. Agardh E, Lundstig A, Perfilyev A, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in subjects with type 1 diabetes identifies epigenetic modifications associated with proliferative diabetic retinopathy. *BMC Med* 2015;13:182.
46. Khullar M, Cheema BS, Raut SK. Emerging evidence of epigenetic modifications in vascular complication of diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:237.
47. Miao F, Smith DD, Zhang L, et al. Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation: an epigenetic study in diabetes. *Diabetes* 2008;57:3189-98.

48. Orban T, Kis J, Szeready L, et al. Reduced CD4+ T-cellspecific gene expression in human type 1 diabetes mellitus. *J Autoimmun* 2007;28:177-87.
49. Chen SS, Jenkins AJ, Majewski H. Elevated plasma prostaglandins and acetylated histone in monocytes in type 1 diabetes patients. *Diabet Med: J Bri Diabet Assoc* 2009;26:182-6.
50. Miao F, Chen Z, Zhang L, et al. Profiles of epigenetic histone post-translational modifications at type 1 diabetes susceptible genes. *J Biol Chem* 2012;287:16335-45.
51. Miao F, Chen Z, Genuth S. Evaluating the role of epigenetic histone modifications in the metabolic memory of type 1 diabetes. *Diabetes* 2014;63:1748-62.
52. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, De Souza BM, et al. MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis. *Endocr Connect* 2017;6:773-90.
53. Snowwhite IV, Allende G, Sosenko J, et al. Association of serum microRNAs with islet autoimmunity, disease progression and metabolic impairment in relatives at risk of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2017;60:1409-22.
54. Erener S, Marwaha A, Tan R, et al. Profiling of circulating microRNAs in children with recent onset of type 1 diabetes. *JCI Insight* 2017;2:e89656.
55. Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, et al. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 2007;56:2938-45.
56. Kloosterman WP, Legendijk AK, Ketting RF, et al. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007;5:e203.
57. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:5813-8.
58. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432:226-30.
59. Marchand L, Jalabert A, Meugnier E, et al. miRNA-375 a Sensor of glucotoxicity is altered in the serum of children with newly diagnosed type 1 diabetes. *J Diabetes Res* 2016;2016:1869082.
60. Nielsen LB, Wang C, Sørensen K, et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed Type 1 Diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:896362.
61. Salas-Perez F, Codner E, Valencia E, et al. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology* 2013;218:733-7.
62. Garcia-Contreras M, Shah SH, Tamayo A, et al. Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes. *Sci Rep* 2017;7:5998.
63. Figliolini F, Cantaluppi V, De Lena M, et al. Isolation, characterization and potential role in beta cell-endothelium cross-talk of extracellular vesicles released from human pancreatic islets. *PLoS One* 2014;9:e102521.
64. Farr RJ, Joglekar MV, Taylor CJ, et al. Circulating non-coding RNAs as biomarkers of beta cell death in diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013;11:14-20.
65. Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I, et al. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:862-6.
66. Bijkerk R, Duijs JM, Khairoun M, et al. Circulating microRNAs associate with diabetic nephropathy and systemic microvascular damage and normalize after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Am J Transplant* 2015;15:1081-90.
67. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, et al. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2008;57:2708-17.
68. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011;474:649-53.
69. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, et al. Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data. *Sci Rep* 2017;7:8413.

Meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'allergia al latte vaccino

Fatima Domenica Elisa De Palma¹, Lorella Paparo², Rita Nocerino², Roberto Berni Canani^{1,2}, Francesco Salvatore^{1,3}, Valeria D'Argenio^{1,3}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Napoli

²Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali e ³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

ABSTRACT

Epigenetics and cow's milk allergy: implication for pathogenesis. Cows' milk allergy (CMA) is one of the most frequent allergies in child, often occurring quite soon after birth. Recent years have been featured by an increasing prevalence of CMA that can often be the first appearance of the so-called "atopic march". Typically, CMA is featured by immunoglobulin E (IgE)-mediated reactions; however, the pathogenetic basis of IgE-mediated CMA is not yet completely understood. Recent evidences suggest that epigenetic factors, such as DNA methylation and regulatory non-coding RNAs could play a role in allergic diseases, including CMA. Here, we review the state of the art regarding the involvement of some epigenetic modifications in allergic diseases, and especially in CMA. We describe that epigenetic derived molecules, in addition to be pathogenetic factors contributing to typical CMA allergic phenomena, could also serve to produce molecules which may act as novel, specific and easily accessible biomarkers for CMA diagnosis and monitoring.

INTRODUZIONE

L'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) è una delle più frequenti allergie alimentari in età pediatrica (1, 2). Si tratta di una reazione di ipersensibilità immunologica specifica nei confronti di una o più proteine del latte vaccino, con un picco d'insorgenza nel primo anno di vita. L'APLV non va confusa con l'intolleranza al lattosio, caratterizzata da un deficit dell'enzima lattasi e con una tipica insorgenza nelle età successive (3). L'APLV colpisce il 2-3% dei bambini nel primo anno di vita. La prognosi a lungo termine nella maggior parte dei casi è favorevole, dal momento che oltre il 50% dei pazienti acquisisce la tolleranza immunologica alle proteine del latte entro il sesto anno di vita (4). Studi recenti, tuttavia, hanno evidenziato un incremento non solo dell'incidenza, ma anche della gravità dell'APLV (5). Infatti, benché ogni paziente mostri uno spettro individuale di manifestazioni sintomatologiche, caratterizzate anche da una severità estremamente variabile nel corso della propria vita, l'APLV può essere anche il primo segno clinico della cosiddetta marcia atopica. Per marcia atopica si intende una manifestazione sequenziale di patologie allergiche

che si sviluppano nel corso della vita a partire, in genere, dall'allergia alimentare (6-10). Infine, tipiche allergie alimentari associate all'infanzia, quali l'APLV, sempre più spesso tendono alla persistenza fino all'età adulta. Mentre nelle prime epoche della vita si osserva una prevalenza nel sesso maschile, questa tendenza si inverte dopo la pubertà e durante l'età adulta, con una maggiore prevalenza nelle donne (11). Anche se non sono state studiate le cause della diversa prevalenza con l'età nei due generi, è possibile ipotizzare che cause ormonali possano intervenire nel determinare tale differenza.

In generale, tipica delle patologie allergiche è la presenza di un'inflammatione cronica a livello delle mucose e della pelle, che riflette la presenza di un'anomala risposta immunitaria verso antigeni ambientali generalmente innocui. A causa di fattori genetici e/o ambientali, tali antigeni, in seguito a inalazione, ingestione, o contatto cutaneo, sono riconosciuti dal sistema immunitario come estranei, "non-self", scatenando così una reazione allergica (12).

L'APLV può essere classificata da un punto di vista eziopatogenetico in tre classi principali: immunoglobuline E (IgE)-mediata, non IgE-mediata e mista (IgE e non IgE-

Corrispondenza a: Francesco Salvatore, CEINGE-Biotecnologie Avanzate e Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Ed. 19, Via Sergio Pansini 5, 80131 Napoli. Tel. 0817463133, Fax 0817463650; E-mail salvator@unina.it

Ricevuto: 06.02.2018

Revisionato: 22.03.2018

Accettato: 26.03.2018

Publicato on-line: 04.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.021

mediata) (Tabella 1) (13).

In ~50% dei casi è possibile osservare un meccanismo IgE-mediato caratterizzato da una reazione di ipersensibilità di tipo I a rapida insorgenza, che si manifesta, in genere, entro 120 minuti dall'assunzione di alimenti contenenti proteine del latte vaccino. La severità clinica è variabile, da lieve a molto grave con quadri di anafilassi anche fatali (Tabella 1). Dal punto di vista immunologico, l'APLV IgE-mediata è caratterizzata a livello ematico da un'atipica risposta immunitaria associata a infiammazione allergica con risposte immunitarie T-helper 2 (Th2)-mediate, come conseguenza della presentazione degli allergeni da parte delle cellule presentanti l'antigene (ad esempio, cellule dendritiche e macrofagi) alle cellule T naïve. Queste cellule, a seguito di una serie di segnali a cascata indotti dalla presentazione dell'antigene/allergene, si differenziano in cellule effettrici Th2, che sono in grado di produrre un insieme unico di citochine, dette di tipo 2, tra cui le interleuchine (IL) 4, 5, 13 e 9 (12). Queste citochine sono responsabili della fase effettrice della risposta allergica, in quanto non solo sono in grado di aumentare la produzione di muco a livello epiteliale, alterare la permeabilità di membrana e la contrattilità muscolare, ma sono anche responsabili della produzione di IgE specifiche da parte dei linfociti B (12). Le molecole di IgE si legano a specifici recettori espressi sulla superficie di mastociti e basofili e, dopo il legame con l'allergene, determinano il rilascio da parte di tali cellule di mediatori della risposta allergica (tra cui l'istamina) che sono responsabili dell'insorgenza dei tipici sintomi allergici (Figura 1) (12).

L'APLV non IgE-mediata, invece, ha un'insorgenza tardiva che si manifesta dopo diverse ore o giorni dall'ingestione di alimenti contenenti proteine del latte vaccino. Le manifestazioni cliniche sono prevalentemente a carico del tratto gastrointestinale, con gravità clinica variabile (Tabella 1). Dal punto di vista fisiopatologico, include reazioni di ipersensibilità di tipo III (mediata da immunocomplessi con immunoglobuline di tipo A o G) o di tipo IV [cellulo-mediata, con stimolazione dei linfociti T-helper di tipo 1 (Th1)] (14, 15).

Infine, l'APLV può manifestarsi in forma mista; in tal caso, i bambini affetti presentano reazioni allergiche miste, con manifestazioni cliniche, gravità e sintomi propri sia dell'APLV IgE-mediata che della forma non IgE-mediata (Tabella 1) (15).

In una percentuale elevata di casi, la diagnosi di APLV rimane difficoltosa da stabilire per l'ampia varietà delle manifestazioni cliniche a carico dell'apparato digerente, respiratorio e cutaneo; spesso tali sintomi sono comuni ad altre malattie atopiche, rendendo difficile la diagnosi differenziale (15, 16). Inoltre, allo stato attuale, non esistono dei test di conferma semplici da eseguire e/o specifici. Infatti, i test di screening allergologico come la misura delle IgE sieriche specifiche, lo "skin prick test" e l'"atopy patch test", presentano dei limiti poiché sono associati ad alte percentuali di falsi positivi. Il "gold standard" per la diagnosi è basato sul test di provocazione orale che spesso deve essere eseguito in ambiente protetto per i rischi associati alla possibile insorgenza di reazioni anafilattiche cutanee, gastroenteriche, respiratorie e sistemiche anche gravi.

Tabella 1

Caratteristiche delle principali classi di allergie alle proteine del latte vaccino

Tipo	Tempo di latenza	Sintomi	Gravità clinica	Test diagnostici	Trattamento
IgE-mediata	Immediato (minuti - ore)	Reazioni cutanee, coliche addominali, nausea, vomito, diarrea, sintomi simil-febbrili, difficoltà respiratorie	Da lieve a grave	S-IgE, SPT, DBPCFC	Standard: dieta di eliminazione; Sperimentale: OIT, SLIT, EPIT, omalizumab
Non IgE-mediata	Tardivo (ore - giorni)	Coliche addominali, reazioni cutanee o eczema, reflusso, diarrea, sangue e/o muco nelle feci, dolori addominali, stipsi, difficoltà respiratorie o dispnea, difetti di accrescimento	Da lieve a moderata	DBPCFC, dieta di eliminazione	Standard: dieta di eliminazione
Mista (IgE-mediata/ non IgE-mediata)	Immediato o tardivo	Coliche addominali, reazioni cutanee o eczema, reflusso, diarrea, sangue e/o muco nelle feci, dolori addominali, stipsi, difficoltà respiratorie o dispnea, difetti di accrescimento	Da lieve a grave	S-IgE, SPT, DBPCFC, dieta di eliminazione	Standard: dieta di eliminazione

IgE, Immunoglobuline E; S-IgE, IgE sieriche; SPT, "skin prick test"; DBPCFC, test di provocazione orale in doppio cieco contro placebo; OIT, immunoterapia orale; SLIT, immunoterapia sublinguale; EPIT, immunoterapia epicutanea.

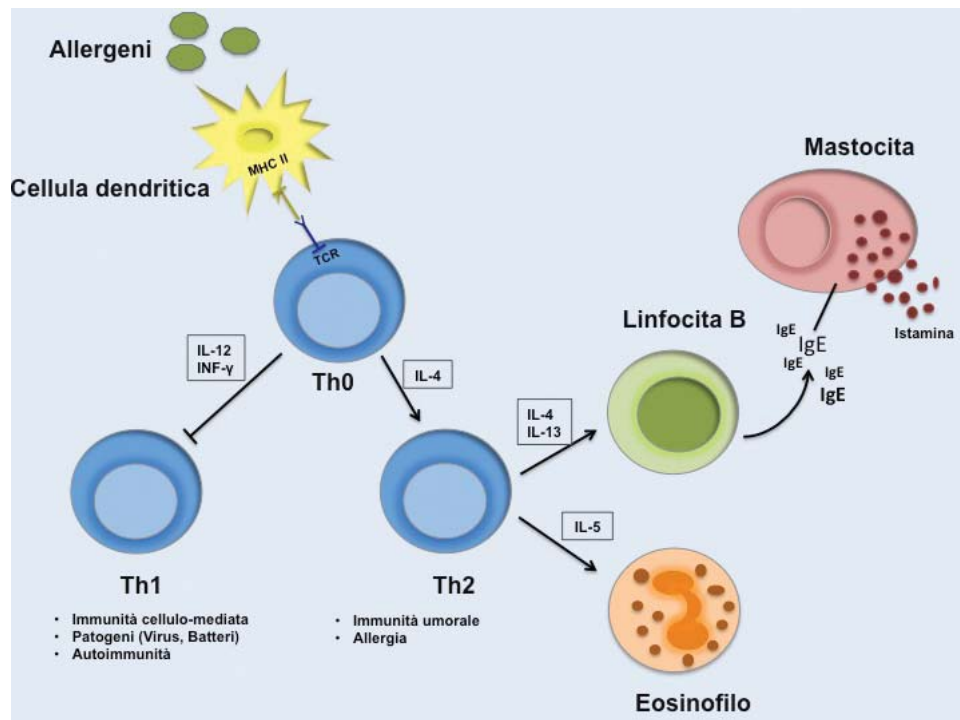


Figura 1

Risposta Th2-mediata nell'allergia al latte vaccino. In seguito all'assunzione di latte vaccino (allergene), il riconoscimento dell'allergene (proteine del latte) da parte delle cellule dendritiche determina la presentazione dell'antigene ai linfociti T, il conseguente differenziamento dei linfociti Th0 in Th2 e la produzione delle citochine pro-infiammatorie Th2-associate. L'aumento di IL-4 e IL-13 attiva i linfociti B e favorisce la produzione di IgE che stimolano la liberazione di istamina da parte dei mastociti; l'aumento dell'IL-5, derivata dalle cellule Th2, recluta gli eosinofili. La produzione di IL-12 e IFN-γ e, quindi, la risposta Th1-mediata sono così inibite.

Th, T helper; IL, interleuchina; IFN, interferone; MCH, antigeni di istocompatibilità maggiore, IgE, immunoglobuline E.

Per quanto concerne la terapia, questa si basa sull'eliminazione dalla dieta del bambino di qualsiasi alimento contenente proteine del latte vaccino, sostituito invece con formule estensivamente idrolizzate (eHFs) a base di amminoacidi liberi, soia o riso (17, 18).

I fattori eziopatogenetici associati all'insorgenza dell'APLV non sono ancora del tutto noti. Ad oggi, diversi fattori di rischio sono stati associati all'insorgenza dell'APLV, sia genetici sia ambientali (19). Si ritiene, infatti, che alla base dell'APLV, come in altre patologie allergiche, vi sia una predisposizione genetica (20). Nonostante siano stati compiuti grandi sforzi per svelare le basi molecolari di tali malattie allergiche, non sono stati individuati geni malattia-specifici, ma è ora opinione comune che le malattie allergiche siano patologie multifattoriali e poligeniche. Ad oggi, un grande numero di geni che codificano molecole che regolano l'attivazione dei linfociti T, lo sviluppo dei linfociti B, la presentazione dell'antigene o la produzione di varie citochine, recettori o fattori di crescita, sono stati identificati come loci di suscettibilità per le patologie allergiche o come fattori in grado di determinare l'espressività del fenotipo (21). Per quanto concerne l'APLV, recentemente, Henneman P et al. hanno identificato, in una coorte di 53 bambini tedeschi, due polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) significativamente associati all'APLV (22). Dei due, uno

è localizzato nel locus del recettore "toll-like" di tipo 6 (TLR6), che funzionalmente interagisce con il recettore "toll-like" di tipo 2 (TLR2) (associato all'aumento del rischio di allergie); l'altro, invece, è localizzato a livello del locus di IL-2. Tale studio suggerisce che variazioni nei geni *TLR6* e *IL-2* possono contribuire all'insorgenza dell'APLV e favorire l'inizio della marcia atopica (22).

Questi fattori genetici, tuttavia, non sono in grado di spiegare l'aumento d'incidenza e prevalenza delle malattie allergiche osservato negli ultimi anni, inclusa l'APLV. È ormai opinione diffusa che fattori ambientali, *in primis* gli stili di vita tipici dei paesi occidentali, abbiano un ruolo fondamentale nell'induzione e nel mantenimento delle reazioni infiammatorie di tipo 2 in soggetti geneticamente predisposti (12). È fondamentale, dunque, capire i meccanismi cellulari e molecolari attraverso i quali i fattori ambientali influenzano l'inizio e/o la progressione della malattia allergica. In questo contesto, i meccanismi epigenetici potrebbero avere un ruolo significativo (23): l'epigenetica, infatti, potrebbe spiegare sia l'elevato grado di plasticità delle risposte immunitarie osservato nel corso della vita, sia l'impatto di stimoli ambientali sullo sviluppo del fenomeno patologico (24). Recentemente, molta attenzione è stata rivolta al ruolo dell'epigenetica nelle malattie allergiche, in generale, e nell'APLV in particolare, anche per il potenziale utilizzo di

specifiche caratteristiche epigenetiche come nuovi potenziali biomarcatori e/o target terapeutici. Recenti studi, infatti, hanno dimostrato il coinvolgimento di meccanismi epigenetici nella patogenesi delle malattie atopiche e dell'APLV con incoraggianti risultati in tal senso (25).

Questa rassegna ha lo scopo di evidenziare il ruolo dei meccanismi epigenetici più comuni nell'insorgenza delle malattie atopiche e, in particolare, dell'APLV, e come profili epigenetici malattia/allergia-specifici, possano essere utili non solo per elucidare le basi patogenetiche di tali patologie, ma anche per identificare nuovi target molecolari malattia-specifici che possano essere utilizzati per implementare processi diagnostici comunemente utilizzabili o, altresì, per guidare lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici (24-27).

EPIGENETICA: DEFINIZIONE E RUOLO NELL'ALLERGIA AL LATTE VACCINO

L'epigenetica, branca della genetica, fonda le sue basi alla fine dell'800 e nella prima metà del '900 con Miescher, Flemming, Kossel e Heitz attraverso la definizione di cromatina, proteine istoniche e distinzione citologica di eucromatina ed eterocromatina (27-29).

In realtà, il termine epigenetica è stato coniato nel 1942 dal biologo inglese Conrad Waddington (30), il quale, effettuando degli studi su *Drosophila*, ipotizzò che lo sviluppo embrionale non avvenisse tramite alterazioni genetiche (perdita o acquisizione di geni), ma attraverso la modulazione della loro espressione, e definì, così, l'epigenetica come *"la branca della biologia che studia le interazioni causali fra i geni e il loro prodotto, che portano alla manifestazione di un fenotipo"* (30). L'epigenetica, inizialmente legata allo studio di meccanismi di regolazione di espressione genica quali l'inattivazione del cromosoma-X, imprinting, metilazione del DNA (DNAm), modificazioni degli istoni (acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione), è poi stata ampliata con l'identificazione di molecole coinvolte anche nel silenziamento genico e nel meccanismo della traduzione, RNA non codificanti, fino ad arrivare ai giorni d'oggi a studi di immunoprecipitazione della cromatina seguiti da sequenziamento di nuova generazione (ChIP-seq), che hanno permesso di definire profili di modificazioni epigenetiche malattia-specifici (31, 32).

Di recente si è iniziato a studiare il ruolo dell'epigenetica nelle malattie allergiche (23-26). Studi relativi alle componenti epigenetiche dell'allergia sono stati finora limitati, soprattutto a causa del piccolo numero di pazienti analizzati e/o per l'assenza di studi confirmatori (24). Attualmente sono in corso progetti su larga scala che, attraverso l'analisi di ampie coorti, si prefiggono di indagare l'impatto dei fattori ambientali sull'epigenoma e il loro ruolo nei meccanismi iniziali di eziopatogenesi di malattie allergiche durante l'infanzia (21, 24). Una volta validate su larga scala e verificato il loro significato funzionale, queste caratteristiche epigenetiche potrebbero in futuro integrare e, forse, sostituire gli attuali test diagnostici e/o essere utilizzate

per prevedere la risposta a specifiche terapie. Infine, le stesse alterazioni epigenetiche potrebbero rappresentare nuovi target per lo sviluppo di terapie innovative finalizzate alla correzione dello squilibrio epigenetico specificamente correlato all'insorgenza di una malattia allergica.

Nell'ultimo decennio, l'avvento di nuove tecniche di biologia molecolare e, in particolare, di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), in grado di analizzare simultaneamente numerose regioni genomiche (o interi genomi) in modo accurato e in tempi rapidi, ha dato un nuovo impulso agli studi nel campo delle scienze cosiddette omiche in generale, incluso il settore dell'epigenetica (33). Infatti, la versatilità e la continua evoluzione di tali tecnologie hanno permesso al NGS di poter essere impiegato per una molteplicità di applicazioni allo scopo di studiare le basi molecolari di numerosi processi biologici, diventando così una metodica di elezione per la ricerca di base e traslazionale (34-41). Utilizzando approcci basati su sequenziamento NGS, infatti, non solo è stato possibile analizzare con elevato livello di accuratezza interi genomi o regioni genomiche di interesse più o meno estese, ma anche studiare in maniera sempre più dettagliata il trascrittoma, il miRNoma, il metiloma e i geni del microbioma umano (34-41). Infine, le tecniche di NGS stanno imponendo nuovi standard anche nel settore della diagnostica molecolare grazie alla possibilità di analizzare in tempi rapidi e con un'elevata accuratezza e sensibilità analitica, e quindi anche diagnostica, geni umani alterati associati all'insorgenza di specifiche patologie umane (42-44). Non sorprende, dunque, che le metodiche di NGS stiano contribuendo a elucidare le basi molecolari dei meccanismi epigenetici, nonché le loro possibili alterazioni in presenza di specifiche patologie, anche per l'identificazione di nuovi e specifici biomarcatori da introdurre nella pratica clinica (45, 46).

Sulla base di tali osservazioni, è possibile prevedere che i cambiamenti epigenetici nelle malattie allergiche saranno un importante tema della ricerca nei prossimi anni e che le informazioni acquisite potrebbero avere nel prossimo futuro un impatto importante sulla pratica clinica.

Nei paragrafi successivi verrà descritto lo stato delle attuali conoscenze relative al ruolo di due specifici meccanismi epigenetici, metilazione del DNA e RNA non codificanti, nell'insorgenza dell'APLV (Figura 2).

Metilazione del DNA

La metilazione è una modifica biochimica del DNA che consiste nell'aggiunta di un gruppo metilico al carbonio in posizione 5 dell'anello delle citosine presenti a livello delle isole CpG (gruppo dinucleotidico Citosina-Guanina) nella regione del promotore del gene, ad opera di enzimi noti come DNA-metiltransferasi (DNMTs).

Tale modifica rappresenta, in realtà, un meccanismo di regolazione dell'espressione genica utilizzato dalle cellule. In particolare, è usato per silenziare l'espressione di un determinato gene target, impedendone la

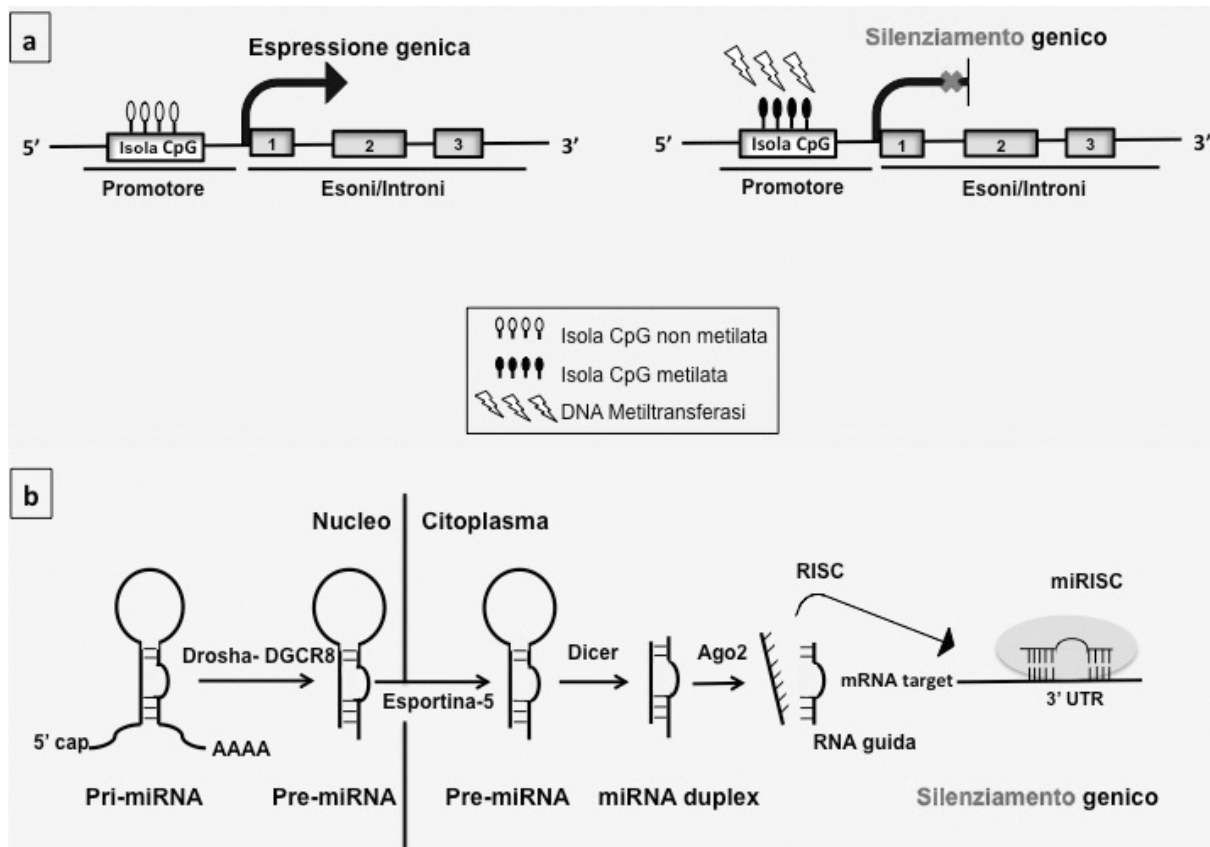


Figura 2

Meccanismi epigenetici coinvolti nella regolazione dell'espressione genica.

a. La metilazione delle citosine delle isole CpG (gruppo dinucleotidico Citosina-Guanina) presenti a livello del promotore di geni, da parte degli enzimi metiltransferasi, inibisce l'espressione del gene. 1,2,3: esoni del gene.

b. La maturazione dei miRNA inizia a livello nucleare con la produzione da parte dell'RNA polimerasi II o III di un trascritto primario con struttura a forcina (Pri-miRNA), caratterizzato da un cappuccio al 5' e una coda poli(A) al 3'. Il Pri-miRNA è poi clivato dal complesso Drosha-DGCR8 per la produzione del Pre-miRNA, un trascritto di ~70 nucleotidi. Al termine del processamento nucleare il Pre-miRNA è esportato nel citoplasma tramite il trasportatore nucleocitoplasmatico Exportina-5; a livello citoplasmatico è ulteriormente processato dall'RNasi di tipo III Dicer, generando, così, una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA o duplex) di 22 nucleotidi. Tale dsRNA viene riconosciuta, legata e infine srotolata dalla proteina Argonauta 2 (Ago2), formando, così, il filamento guida o miRNA maturo ed il filamento passeggero. A questo punto, il filamento guida legato ad Ago è incorporato nel complesso che induce il silenziamento dell'RNA (RISC), mentre il filamento passeggero è sottoposto a degradazione. Ago ha la funzione di dirigere il miRNA verso siti complementari dell'estremità 3'-UTR degli mRNA bersaglio. L'appaiamento miRNA/mRNA bersaglio determina il silenziamento post-trascrizionale del gene target non consentendone la traduzione e/o inducendo la degradazione dell'RNA messaggero.

trascrizione e quindi l'attività (Figura 2a).

Vari studi hanno dimostrato che alterazioni della DNAm (iper/ipometilazione), a livello dei promotori di specifici geni coinvolti nella regolazione delle risposte immunitarie di tipo allergico, giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della reazione allergica a partire già dal differenziamento dei timociti in linfociti CD4+, nel mantenimento del corretto bilanciamento Th1/Th2 e inoltre anche nella liberazione delle citochine associate alle risposte allergiche (47-55).

Uno studio condotto nel 2002 da Lee DU et al. ha dimostrato che il locus dell'IL-4 subisce una serie di metilazioni e demetilazioni successive influenzando il differenziamento dei linfociti T. La regione al 5' dell'IL-4 risulta, infatti, ipermetilata nei linfociti T naïve, mentre

risulta demetilata nei linfociti Th2 (48). Successivamente, van Panhuys N et al. (49), hanno dimostrato che l'ipometilazione del DNA a livello dei linfociti Th2, correlata all'aumento dell'acetilazione degli istoni, determina l'apertura della cromatina e, di conseguenza, il reclutamento dell'apparato trascrizionale necessario all'espressione delle citochine Th2-associate, tra cui IL-4, IL-5, IL-13, tipiche della risposta allergica. Alterazioni epigenetiche sono state identificate anche a livello del locus dell'interferone- γ (IFN- γ) (50). L'ipermetilazione dell'IFN- γ , determinandone il silenziamento e, quindi, inibendo la produzione della citochina stessa, è correlata positivamente con la liberazione delle IgE durante la risposta allergica (50).

Nel 2014, Martino D et al., basandosi su studi di "genome-wide" (ovvero a livello dell'intero genoma) in bambini con allergie alimentari IgE-mediate (proteine del latte, uova, arachidi), hanno dimostrato che esistono differenze nello stato di metilazione a livello dei linfociti T CD4+, principali regolatori e partecipanti della risposta immunitaria contro uno specifico allergene (51). Successivamente, Berni Canani R et al. (52) hanno approfondito le evidenze precedenti che correlavano le alterazioni della metilazione all'APLV, ponendo particolare attenzione al monitoraggio della patologia e, quindi, al processo di acquisizione della tolleranza nei bambini affetti. Tale studio ha dimostrato che la metilazione del DNA nell'APLV IgE-mediata è un processo dinamico ed è correlabile all'andamento della patologia (52). Infatti, bambini affetti da APLV, ma che acquisiscono tolleranza alle proteine del latte vaccino, mostrano un pattern di metilazione specifico a livello dei promotori dei geni delle citochine Th1/Th2 associati e significativamente diverso rispetto a bambini con allergia in atto. In particolare, in questi bambini, il tasso di metilazione a livello del promotore dei geni per *IL-4*, *IL-5* risulta essere più basso, mentre per *IL-10* e *INF- γ* è più alto nei bambini con allergia in atto, rispetto ai bambini non allergici e a quelli che hanno acquisito tolleranza orale. Inoltre, lo stato di metilazione tra non allergici e tolleranti è risultato molto simile. Particolarmente interessante è, infine, la correlazione negativa tra il tasso di metilazione delle citochine e la concentrazione delle stesse a livello sierico in pazienti con APLV rispetto ai non allergici e tolleranti (52). Questo dimostra non solo come lo stato di metilazione vada a influenzare l'espressione di citochine Th1 o Th2 specifiche, ma anche come i cambiamenti nel tasso di metilazione, essendo specifici di uno stato preciso della malattia allergica, possano essere utilizzati come marcatori epigenetici nell'APLV IgE-mediata e, in particolare, per determinare l'acquisizione della tolleranza orale. Sulla scia dei precedenti studi, nel 2016 Hong X et al., tramite uno studio di "genome-wide", hanno identificato diversi geni correlati con la risposta Th1/Th2-mediata differenzialmente metilati in bambini con APLV rispetto a bambini non allergici (53). Un esempio è il gene *NDFIP2*, che favorisce il differenziamento dei T naïve in linfociti Th1 inducendo la liberazione di *IFN- γ* e quindi sostenendo la risposta Th1-mediata (53).

Studi di regolazione epigenetica sono stati, inoltre, condotti anche per valutare lo stato di metilazione del gene che codifica per il fattore di trascrizione "*Forkhead box P3*" (*FoxP3*) in relazione allo sviluppo della tolleranza orale nell'APLV (54). *FoxP3* è un gene fondamentale per lo sviluppo e la funzione dei linfociti T-regolatori CD4+CD25+ (Treg), che hanno il ruolo di sopprimere l'attivazione di cellule T autoreattive (55). Sulla base di precedenti evidenze, in cui bambini con allergie alimentari IgE-mediate mostravano livelli di mRNA di *FoxP3* più bassi rispetto a bambini sani, e anche che l'ipermetilazione del promotore del gene *FoxP3* era associata a una ridotta funzione dei Treg (55), Paparo L et al. hanno dimostrato che vi è una

significativa alterazione nel tasso di metilazione del gene *FoxP3* in pazienti che acquisiscono tolleranza orale (54). Tale studio mostra che vi è una minore demetilazione del gene *FoxP3* nei pazienti con allergia in atto rispetto sia a bambini che acquisiscono tolleranza orale sia ai controlli non allergici. Inoltre, bambini trattati per l'acquisizione della tolleranza con formule estensivamente idrolizzate della caseina (EHCF) in associazione al probiotico *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG), mostrano un tasso di demetilazione più alto rispetto al trattamento con altre formule; il che dimostra che uno specifico tipo di trattamento della tolleranza orale può influenzare la modifica epigenetica (54). Questo studio, seppur preliminare, non solo dimostra che il tasso di demetilazione del gene *FoxP3* può contribuire all'eziopatogenesi dell'APLV, ma anche che modifiche dell'alimentazione possono influenzare questo meccanismo epigenetico. Ne consegue che, se opportunamente validato, il tasso di demetilazione del gene *FoxP3* potrebbe essere utilizzato come nuovo biomarcatore per monitorare l'acquisizione della tolleranza, nonché per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e terapeutici.

Un ruolo importante nella regolazione epigenetica e dell'espressione di geni che determinano le funzioni dei linfociti T e le risposte Th1/Th2-mediate è svolto anche dagli enzimi DNMTs (56). Studi sui DNMTs hanno rivelato che variazioni dell'espressione di questi enzimi sono correlate a cambiamenti di espressione delle citochine responsabili delle risposte allergiche. Ad esempio, la down-espressione di DNMT di tipo 1 (DNMT1), fondamentale per il mantenimento dello stato di metilazione del DNA, causa cambiamenti nell'espressione delle citochine *IL-2* e *IFN- γ* , determinando un silenziamento della risposta Th2-mediata (56).

Considerati nel loro insieme, tutti questi studi dimostrano come, nell'ambito delle malattie atopiche e dell'APLV, la metilazione del DNA possa rappresentare un target per monitorare e, forse in futuro, trattare l'APLV e, in particolare, l'insorgenza della tolleranza orale alle proteine del latte vaccino IgE-mediata.

RNA non codificanti

Negli ultimi anni, numerosi sono stati gli studi effettuati sul ruolo e sull'identificazione degli RNA non codificanti (ncRNA), in particolare dei miRNA e "long non-coding RNA" (lncRNA), come biomarcatori diagnostici, prognostici, e/o come potenziali target terapeutici in associazione alle più disparate patologie umane. I ncRNA sono RNA funzionali trascritti ma non tradotti in proteine; la loro funzione principale è quella di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Figura 2b). Ad oggi, alterati livelli di espressione di ncRNA in soggetti sani rispetto ai malati sono stati descritti in diverse malattie (57, 58).

I miRNA, scoperti nel 1993, sono RNA a singolo filamento di ~22 nucleotidi di lunghezza; essi possono sopprimere direttamente l'espressione genica legandosi

alla regione non tradotta (UTR) al 3' dell'mRNA dei geni target, o indirettamente, influenzando ad esempio meccanismi epigenetici (Figura 2b). Grazie alla loro presenza e stabilità a livello plasmatico, alla possibilità di una facile determinazione, e in particolare ai loro livelli di espressione malattia-specifici, i miRNA potrebbero essere utilizzati come validi biomarcatori ematici in diverse patologie, nelle quali le attuali modalità diagnostiche e di monitoraggio sono invasive. Un esempio è rappresentato dalle esofagiti eosinofile (EoE) che coinvolgono procedure endoscopiche (59, 60).

Studi recenti hanno evidenziato il coinvolgimento dei miRNA anche nella regolazione dei meccanismi patogenetici delle malattie atopiche (61, 62), inclusi l'attivazione di linfociti T, l'attivazione della risposta epiteliale IL-13-mediata, la differenziazione e la risposta Th1/Th2-mediata (61-69).

Un caso esemplificativo è rappresentato da un miRNA (miR-146a), molto espresso a livello dei linfociti Treg. Il coinvolgimento del miR-146a nelle allergie è stato studiato da Li-Fan Lu et al. (63). Lo studio ha dimostrato che questo miRNA svolge un ruolo nel controllo della risposta Th1-mediata. In particolare, esso regola negativamente l'espressione dei linfociti Treg, ovvero la capacità dei Treg di limitare la risposta Th1 IFN- γ -mediata agendo specificamente sul fattore "Signal transducer and activator of transcription 1" (Stat1). Infatti, topi deficienti di miR146a a livello dei Treg, mostrano alterati livelli di IFN- γ (63).

Un ruolo chiave nell'infiammazione e nell'autoimmunità è svolto anche un altro miRNA (miR-21). Tale miRNA, molto espresso nelle malattie atopiche, regola la funzione e il differenziamento dei linfociti T naïve (64-67). Lu TX et al. hanno dimostrato che nelle malattie asmatiche il miR-21 inibisce il differenziamento dei linfociti Th1 e l'attivazione della risposta immunitaria Th1-associata, favorendo, invece, la risposta Th2-mediata (66). Topi miR-21 deficienti (miR-21-/-) mostrano, nel fluido di lavaggio broncoalveolare, aumentati livelli di INF- γ e della "Chemokine (C-X-C motif) ligand 9" (CXCL9), una chemochina che induce la liberazione dell'INF- γ , rispetto a topi "wild-type". Anche a livello dei linfociti T, l'INF- γ risulta aumentato, rispetto, invece, all'IL-4, che è fortemente ridotta. Nel 2015, Sawant DV et al. hanno misurato la concentrazione plasmatica di miR-21 in pazienti asmatici e con EoE (67). L'espressione del miR-21, elevata a livello biotico, è risultata molto più alta anche nel plasma dei pazienti allergici rispetto ai controlli non allergici. Ciò ha permesso di definire il miR-21 come biomarcatore associato alle malattie infiammatorie allergiche (67).

Un altro esempio è il miRNA-155, coinvolto sia nell'immunità innata sia acquisita, oltre che nella carcinogenesi (68, 69). Il miR-155 è up-regolato nei linfociti T, B, nelle cellule dendritiche e nei macrofagi; svolge, inoltre, un ruolo importante anche nel differenziamento dei Treg, dei T-helper 17 (Th17) e nella secrezione dell'IL-17 da parte dei Th17. Rui Yao R et al., in una ricerca del 2012, hanno over-espresso e

silenziato il miR-155 nei linfociti T (68). I risultati hanno dimostrato che l'over-espressione del miR-155 determina un aumento dei Treg e Th17 rispetto a cellule controllo, in cui il miRNA non è stato over-espresso. Di contro, silenziando il miR-155, i livelli di Treg e Th17 risultano bassi. Sempre in questo studio, è stata approfondita e dimostrata l'influenza del miR-155 sui Th17, in particolare sulla secrezione di IL-17A (uno dei sei membri della famiglia dell'IL-17), usata dai Th17 per favorire l'infiammazione. È stata valutata sia l'espressione dell'mRNA della citochina IL-17A, sia la quantità di proteina IL-17A secreta nel surnatante cellulare dai linfociti T over-espressanti o silenziati il miR-155. Sia i livelli di mRNA che la quantità di proteina IL-17A risultano significativamente più alti in cellule CD4+ over-espressanti il miR-155, e molto più bassi in cellule CD4+ miR-155 silenziate (68). Il miR-155 è coinvolto anche nella regolazione dell'infiammazione eosinofila Th2-mediata (69). Uno studio condotto *in vivo*, ha mostrato che topi miR-155 deficienti (miR-155-/-) a livello dei linfociti T, hanno una riduzione significativa dell'infiammazione alle vie respiratorie, una ridotta eosinofilia e produzione dell'IL-13, citochina correlata alla risposta allergica Th2-mediata. Tale studio ha anche identificato diversi target del miR-155, tra i quali il gene "Sphingosine-1-phosphatereceptor 1" (S1pr1), che contribuisce notevolmente alla risposta Th2-associata. I risultati ottenuti dimostrano, quindi, che il miR-155 può essere un buon target terapeutico nel trattamento della risposta allergica Th2-mediata (69).

Il coinvolgimento di miRNAs nell'APLV è stato recentemente studiato (70). D'Argenio V et al.; tramite uno studio di caratterizzazione dell'intero miRNoma basato su tecniche NGS, questi Autori hanno identificato un miRNA, il miR-193a-5p, significativamente down-espresso in bambini con APLV IgE-mediata, rispetto a bambini non allergici e rispetto ai bambini che acquisiscono tolleranza (70). Tale miRNA, in seguito a ulteriori studi, potrà essere utilizzato come biomarcatore APLV-associato, confermando l'importanza del ruolo di miRNA malattia-specifici nella diagnosi e prognosi.

Questi dati, seppur preliminari e da confermare su casistiche più ampie, dimostrano che i miRNA sono importanti mediatori delle risposte immuni e, in quanto tali, sono spesso alterati nelle patologie allergiche, inclusa l'APLV. La definizione delle loro funzioni non solo permetterà di chiarire il loro contributo nell'insorgenza delle allergie, ma potrà essere la base per lo sviluppo di nuovi, più sensibili e specifici test diagnostici o di nuove molecole ad azione terapeutica.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni, diversi studi hanno focalizzato la loro attenzione sui meccanismi molecolari coinvolti nell'insorgenza delle allergie, inclusa l'APLV, e sul possibile ruolo di specifiche modificazioni epigenetiche nell'insorgenza di tali patologie. Tali modifiche epigenetiche, infatti, non solo possono costituire nuovi biomarcatori malattia-specifici da utilizzare per la

diagnosi o il monitoraggio di uno specifico processo patologico, ma possono rappresentare anche interessanti e innovativi target per lo sviluppo di nuove terapie. La recente diffusione di metodiche innovative come l'NGS, che permettono analisi genome-wide per lo studio dei miRNA o della DNAm (33), hanno contribuito a dare nuovo impulso a studi nel settore dell'epigenetica e alla ricerca di nuovi biomarcatori malattia-specifici. L'identificazione di biomarcatori permetterebbe di rivoluzionare il mondo della diagnostica nell'ambito delle malattie atopiche, e in particolare delle allergie pediatriche tra cui l'APLV. Allo stato attuale, tra i vari esami diagnostici, la determinazione delle IgE specifiche circolanti è largamente utilizzata per la diagnosi dell'APLV. Tale esame, però, non permette di eseguire una diagnosi preventiva né di predire l'efficacia del trattamento, essendo l'incremento delle IgE circolanti secondario all'introduzione dell'allergene (proteine del latte vaccino). La concentrazione plasmatica di IgE è inoltre associata ad alte percentuali di falsi positivi, dovuti in parte alla cross-reattività nei confronti di proteine omologhe. La determinazione di biomarcatori APLV-specifici nella pratica clinica permetterebbe, con un semplice prelievo ematico, di eseguire una stratificazione prognostica, migliorando nel contempo l'accuratezza diagnostica, e consentirebbe infine di predire e/o monitorare l'acquisizione della tolleranza. Il tutto avrebbe sicuramente un impatto positivo sui bambini affetti e sulle loro famiglie (71).

Questo resta un campo aperto; ulteriori studi e ricerche saranno sicuramente necessari per introdurre e implementare nel prossimo futuro nuovi e più accurati esami diagnostici nell'ambito delle allergie atopiche.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Tătăranu E, Diaconescu S, Ivănescu CG, et al. Clinical, immunological and pathological profile of infants suffering from cow's milk protein allergy. *Rom J Morphol Embryol* 2016;57:1031-5.
- Schoemaker AA, Sprickelman AB, Grimshaw KE, et al. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children—Euro Prevall birth cohort. *Allergy* 2015;70:963-72.
- Bahna SL. Cow's milk allergy versus cow milk in tolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:56-60.
- Cantani A, Micera M. Natural history of cow's milk allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:153-64.
- Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:594-602.
- Van Bever HP, Samuel ST, Lee BW. Halting the allergic march. *World Allergy Organ J* 2008;1:57-62.
- Han H, Roan F, Ziegler SF. The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. *Immunol Rev* 2017;278:116-30.
- Yu W, Freeland DM, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2016;16:751-65.
- Alduraywish SA, Standl M, Lodge CJ, et al. Is there a march from early food sensitization to later childhood allergic airway disease? Results from two prospective birth cohort studies. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;28:30-7.
- Savage J, Sicherer S, Wood R. The natural history of food allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:196-203.
- Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, et al. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta analysis. *Allergy* 2014;69:62-75.
- Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:35-50.
- Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, et al. Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods* 2014;66:22-33.
- Carlos Lifschitz, Hania Szajewska. Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner. *Eur J Pediatr* 2015;174:141-50.
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, et al. World Allergy Organization (WAO) Special Committee on Food Allergy. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:1-125.
- Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014;69:992-1007.
- Dupont C, Bradatan E, Soulaïnes P, et al. Tolerance and growth in children with cow's milk allergy fed a thickened extensively hydrolyzed casein-based formula. *BMC Pediatr* 2016;16:96.
- Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, et al. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 2016;10:742-50.
- Du Toit G, Tsakok T, Lack S, et al. Prevention of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:998-1010.
- Ober C, Yao TC. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 2011;242:10-30.
- Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int* 2013;62:21-8.
- Henneman P, Petrus NC, Venema A, et al. Genetic susceptibility for cow's milk allergy in Dutch children: the start of the allergic march? *Clin Transl Allergy* 2016;6:7.
- Nielsen HM, Tost J. Epigenetic changes in inflammatory and autoimmune diseases. *Subcell Biochem* 2013;61:455-78.
- Potaczek DP, Harb H, Michel S, et al. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics* 2017;9:539-71.
- Quake C, Nadeau KC. The role of epigenetic mediation and the future of food allergy research. *Semin Cell Dev Biol* 2015;43:125-30.
- Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:15-24.
- Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 2016;17:487-500.
- Heitz E. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Bot* 1928;69:762-818.
- Flemming W. Über das Verhalten des Kerns bei der Zellteilung und über die Bedeutung mehrkerniger Zelle. *Arch Pathol Anat* 1879;77:1-28.
- Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942;1:18-20.
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 2007;39:311-8.
- Montagnana M, Lippi G, Danese E. Meccanismi epigenetici: l'esempio del Diabete Mellito tipo 1. *Biochim*

- Clin 2018 doi:10.19186/BC_2018.013.
33. Precone V, Del Monaco V, Esposito MV, et al. Cracking the code of human diseases using next-generation sequencing: applications, challenges and perspectives. *Biomed Res Int* 2015;2015:161648.
 34. D'Argenio V, Notomista E, Petrillo M, et al. Complete sequencing of *Novosphingobium* sp. PP1Y reveals a biotechnologically meaningful metabolic pattern. *BMC Genomics* 2014;15:384.
 35. D'Argenio V, Petrillo M, Pasanisi D, et al. The complete 12 Mb genome and transcriptome of *Nonomuraea gerenzanensis* with new insights into its duplicated "magic" RNA polymerase. *Sci Rep* 2016;6:18.
 36. Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet* 2016;17:257-71.
 37. Nardelli C, Granata I, Iaffaldano L, et al. miR-138/miR-222 Over expression Characterizes the miRNome of Amniotic Mesenchymal Stem Cells in Obesity. *Stem Cells Dev* 2017;26:4-14.
 38. Nardelli C, Granata I, Iaffaldano L, et al. Sex-comparative analysis of the miRNome of human amniotic mesenchymal stem cells during obesity. *Stem Cells Dev* 2017;26:1-3.
 39. Yong WS, Hsu FM, Chen PY. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin* 2016;9:26.
 40. D'Argenio V, Casaburi G, Precone V, et al. Metagenomics reveals dysbiosis and a potentially pathogenic *N. flavescens* strain in duodenum of adult celiac patients. *Am J Gastroenterol* 2016;111:879-90.
 41. D'Argenio V, Torino M, Precone V, et al. The Cause of death of a child in the 18th Century solved by bone microbiome typing using laser microdissection and next generation sequencing. *Int J Mol Sci* 2017. doi: 10.3390/ijms18010109.
 42. D'Argenio V, Frisso G, Precone V, et al. DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *J Mol Diagn* 2014;16:32-44.
 43. Esposito MV, Nunziato M, Starnone F, et al. A Novel Pathogenic BRCA1 Splicing Variant Produces Partial Intron Retention in the Mature Messenger RNA. *Int J Mol Sci* 2016;17:2145.
 44. D'Argenio V, Esposito MV, Telese A, et al. The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: next-generation sequencing supersedes conventional approaches. *Clin Chim Acta* 2015;446:221-5.
 45. Oberg E, Givant C, Fisk B, et al. Epigenetics in clinical practice: characterizing patient and provider experiences with MTHFR polymorphisms and methyl folate. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2015;8:137-50.
 46. Estey EH. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2013;27:1803-12.
 47. Sellars M, Huh JR, Day K, et al. Regulation of DNA methylation dictates Cd4 expression during the development of helper and cytotoxic T cell lineages. *Nat Immunol* 2015;16:746-54.
 48. Lee DU, Agarwal S, Rao A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* 2002;16:649-60.
 49. van Panhuys N, Le Gros G, McConnell MJ. Epigenetic regulation of Th2 cytokine expression in atopic diseases. *Tissue Antigens* 2008;72:91-7.
 50. Liu J, Bellaney M, Al-alem U, Quan C, et al. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Tox Sci* 2008;102:76-81.
 51. Martino D, Joo JE, Sexton-Oates A, et al. Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. *Epigenetics* 2014;9:998-1006.
 52. Berni Canani R, Paparo L, Nocerino R, et al. Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin Epigenetics* 2015;7:38.
 53. Hong X, Ladd-Acosta C, Hao K, et al. Epigenome-wide association study links site-specific DNA methylation changes with cow'smilk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:908-11.
 54. Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, et al. Epigenetic features of FoxP3 in children with cow'smilk allergy. *Clin Epigenetics* 2016;8:86.
 55. Kehrman J, Tatura R, Zeschnigk M, et al. Impact of 5-aza-29-deoxycytidine and epigallocatechin-3-gallate for induction of human regulatory T cells. *Immunology* 2014;142:384-95.
 56. Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, et al. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 2001;15:763-74.
 57. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509-24.
 58. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522-31.
 59. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol* 2016;231:25-30.
 60. Lu TX, Sherrill JD, Wen T, et al. MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1064-75.
 61. Lu TX, Rothenberg ME. Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:3-13.
 62. Lu TX, Lim EJ, Wen T, et al. MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome. *Mucosal Immunol* 2012;5:388-96.
 63. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010;142:914-29.
 64. Murugaiyan G, Garo LP, Weiner HL. MicroRNA-21, T helper lineage and autoimmunity. *Oncotarget* 2015;6:9644-5.
 65. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol* 2009;182:4994-5002.
 66. Lu TX, Hartner J, Lim EJ, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 2011;1:3362-73.
 67. Sawant DV, Yao W, Wright Z, et al. Serum MicroRNA-21 as a biomarker for allergic inflammatory disease in children. *MicroRNA* 2015;4:36-40.
 68. Yao R, Ma YL, Liang W, et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PLoS One* 2012;7:e46082.
 69. Okoye IS, Czieso S, Ktistaki E, et al. Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and anthelmintic immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E3081-90.
 70. D'Argenio V, Del Monaco V, Paparo L, et al. Altered miR-193a-5p expression in children with cow's milk allergy. *Allergy* 2018;73:379-86.
 71. Mussap M, Noto A, Cibecchini F, et al. The importance of biomarkers in neonatology. *Semin Fetal Neonatal Med* 2013;18:56-64.

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

Rony Abou-Khalil, Rayane Bou-Absy, Samar Doumit, Joanna Bitar, Rachel Nasser, Elise Khoury
Holy Spirit University of Kaslik, Faculty of Sciences, Lebanon

ABSTRACT

Traditional herbs and spices are commonly used to control glucose plasma concentration; among these cinnamon (*Cinnamomum verum*) has been recognized to have the greatest effect. A number of studies have shown that adding cinnamon to diet can help to lower the glucose level. The aim of this study is to identify the cinnamon components that are able to modify the plasma glucose concentration. The cinnamon bark of *Cinnamomum verum*, analyzed by HPLC, contains cinnamaldehyde, cinnamic acid as well as eugenol. The effect of these components was studied on glucose-albumin binding in human serum albumin (HSA) and human plasma. Glucose-HSA solutions and human plasma containing no or serial concentrations of cinnamon components were prepared, and free glucose in these solutions was measured by the picric acid method. In our study, cinnamaldehyde and cinnamic acid decreased the levels of free glucose in glucose-HSA solution and in human plasma in a dose-dependent manner while eugenol had no effect. The effect of cinnamaldehyde and/or cinnamic acid is related to the presence of native HSA. Thus, when albumin was absent or has been denatured, cinnamaldehyde and/or cinnamic acid did not modify the free glucose levels, suggesting that the native structure of albumin is essential for such activity. The interaction of HSA with cinnamaldehyde was investigated by fluorescence spectroscopy. Cinnamaldehyde increased the intrinsic fluorescence of the protein and the magnitude of fluorescence intensity of glucose-albumin complex. We concluded that cinnamaldehyde produced a rearrangement in the structure of albumin resulting in an increase of the binding of glucose to albumin.

INTRODUCTION

Cinnamon is considered a flavoring agent in food industry because of its spicy sweet taste; it is also used in perfumery and pharmaceutical industries (1, 2). Cinnamon Ceylon (*Cinnamomum verum*) is a tree of the family Lauraceae, native to Sri Lanka and India (1). Cinnamon is produced within the inner bark of the tree; it is available as more or less broken bark rolls, or as powder of yellow or orange color. Numerous studies have shown that cinnamon has anti-inflammatory, antimicrobial, antiparasitic, antioxidant, anti-tumor, anti-cholesterol, immuno-modulatory and wound healing properties (3-5). Cinnamon has a beneficial effect on glucose metabolism by a mechanism similar to that of insulin. Several studies have shown that cinnamon is effective in reducing blood glucose concentrations in people with diabetes. These studies have not investigated the mechanism of action of cinnamon (6,

7). Mang B et al (8) confirmed that cinnamon extracts have a moderate effect in reducing fasting plasma glucose concentrations in diabetic patients. Khan M et al (9) showed that the intake of 1, 3, or 6 g of cinnamon per day reduces serum glucose in people with type 2 diabetes and suggested that the inclusion of cinnamon in the diet of people with type 2 diabetes could reduce risk factors associated with diabetes. In a recent review, Costello RB et al (10) observed that cinnamon supplement added to standard hypoglycemic medications and other lifestyle therapies had only modest effects on fasting plasma glucose. It was assumed that the activity of cinnamon is probably influenced by the presence of serum albumin in the medium (11). However, Hasanzade F et al (12) showed that using certain amount of cinnamon for 60 days did not change the glucose level of diabetic patients. Other studies suggested that cinnamon is ineffective in helping diabetic patients to stabilize their blood sugar levels

Corrispondenza a: Rony Abou-Khalil, Chemistry and Biochemistry Department, Faculty of Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, B.P. 446 Jounieh, Lebanon. Tel. +9619600900, fax +9619600901, e-mail ronyaboukhalil@usek.edu.lb

Ricevuto: 07.12.2017

Revisionato: 24.02.2018

Accettato: 27.02.2018

Pubblicato on-line: 10.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.023

(13). The debate about the effects of cinnamon on plasma glucose concentrations is far from being resolved.

The major active components of essential oils constituting cinnamon are: cinnamaldehyde, eugenol and cinnamic acid (14, 15).

Cinnamaldehyde (C_9H_8O) is an oily, yellowish liquid with a sweet odor and pungent taste; it is the main constituent of essential oils extracted from the bark of the cinnamon and gives cinnamon its flavor and smell (15). Cinnamaldehyde is an antifungal, antibacterial and a very powerful antioxidant (16). Studies have shown that cinnamaldehyde increases the rate of glucose transporter 4 (Glut4) that transports blood glucose into cells lowering thus blood glucose levels (17).

Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) is found in leaves, roots and bark of cinnamon (18, 19); at room temperature, it is a viscous, oily pale-yellow liquid (19). Eugenol has an antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antiviral activity. It is widely applied in dentistry, anesthetics, analgesics, anti-inflammatory agents and as flavoring agent. Research is underway to investigate its anti-carcinogenic effect (19, 20).

Cinnamic acid ($C_9H_8O_2$) is a colorless crystalline powder, with a floral smell of honey derived from phenylalanine deamination. Benzyl esters of cinnamic acid are responsible for the flavor of cinnamon (21). Cinnamic acid is applied in pharmacology against infectious diseases since it has antimicrobial and antifungal properties (22, 23).

The aim of this study is to verify whether cinnamon and/or its components can affect the binding of endogenous compounds to plasma proteins; for this purpose, the interaction of glucose with albumin has been evaluated in the presence and absence of the substance.

Human serum albumin (HSA), the major plasma protein, transports many endogenous and exogenous molecules of varied structure (24). Serum albumin is composed of a polypeptide chain formed of several amino acids, linked by 17 disulfide bonds which hold the chain in 9 loops grouped into three homologous domains (I, II and III) (25). The most notable property of serum albumin is its ability to bind a wide variety of ligands. HSA has six binding sites (site I to VI) distributed along the molecule. The ligands bind on HSA primarily at two sites, site I located in the sub-domain IIA and site II located in the sub-domain IIIA (26). Glucose interacts with lysine, arginine and cysteine residues of site I and II of HSA (27, 28). Cinnamon binds to serum albumin due to its content in flavonoids and polyphenols. Fluorescence spectroscopy reveals that the interaction between HSA and cinnamic acid is at the hydrophobic pocket of sub-domain IIA of site I (29). Cinnamaldehyde binding sites on the protein are mostly or exclusively the thiol groups of cysteine residues (30).

In this study, the effect of cinnamon components (cinnamaldehyde, cinnamic acid, and eugenol) on the glucose levels was evaluated in HSA solution and in

human plasma. Experiments were performed to identify the mechanism by which these components could produce variation in the glucose levels. Fluorescence spectroscopy is a powerful tool for the study of the interaction of chemicals with proteins. Thus, the intrinsic fluorescence of the protein and the fluorescence intensity of glucose–albumin complex were evaluated in the presence and absence of cinnamon components.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cinnamaldehyde (Purity $\geq 99\%$), Cinnamic acid (Purity $\geq 97\%$), Eugenol (Purity $\geq 99\%$) and HSA (purity $\geq 96\%$), were provided by BDH laboratory, England.

The plasma samples were obtained from healthy subjects ($n=13$), from patients with hyperglycemia ($n=9$) and patients with hypoglycemia ($n=6$).

A spectrophotometer (Heliosá; Thermolectron, U.S.A.; bandpass: 2 nm) was used for absorbance measurements at 570 nm.

Preparation of the powdered cinnamon bark

Cinnamon barks (*Cinnamomum verum*), were broken into small pieces and put into a grinding machine to obtain a very fine powder.

Preparation of solutions

HSA (580 μM) was diluted just before experiments in 67 mM phosphate buffer, pH 7.4. Glucose stock solution (stock A) (100 mg/mL) was prepared by dissolving 100 mg of glucose in 100 mL HSA 580 μM . Glucose stock solution (stock B) (100 mg/mL) was prepared by dissolving 100 mg of glucose in 100 mL phosphate buffer (pH 7.4). Stock solutions of cinnamaldehyde, cinnamic acid, and eugenol were prepared in methanol (1 mg/mL).

Human serum albumin denaturation

HSA (580 μM), prepared in 67 mM phosphate buffer pH 7.4, was denatured by heating at 100 °C for 2 hours. HSA denatured by urea was prepared by dissolving HSA 580 μM in 67 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 10 M urea.

Effect of cinnamon on the glucose levels

Powdered cinnamon bark was dissolved in methanol to give standard solution (100 mg/mL). Different volumes were taken and the solvent (methanol) was evaporated. Then human plasma and/or glucose-HSA solution was added.

The final concentrations of powdered cinnamon varied from 0.2 to 50 mg/mL. After 10 minutes incubation at 37 °C, aliquots were taken from glucose–HSA and/or human plasma solution for glucose analysis according to the picric acid method (31).

Extraction of cinnamaldehyde, cinnamic acid and eugenol from the inner bark of *Cinnamomum verum*

Extractions were carried on using ethanol (purity $\geq 99.7\%$), methanol (HPLC grade), ethyl acetate (purity $\geq 99.8\%$) or chloroform (HPLC grade).

10 mg of the powdered cinnamon bark and 50 mL of each of the above organic solvents were mixed at room temperature for two hours and then centrifuged for 15 minutes at 10,000 rpm (4 °C). The supernatant was collected and evaporated with a rotary evaporator.

HPLC-UV detection: Extracts were dissolved in eluent solution (methanol/acetonitrile/water - 30:10:60 v/v/v) and analyzed with a semi-preparative column C18 (250×10 mm, 5 μ m). Elution was run at a flow rate of 1 mL/min for 60 minutes. The sample injection volume was 10 μ L. Substances were detected at 295 and 315 nm. Components eluted between 1 and 8 minutes were collected as well as that at a retention time of 13.83 min and the solvents were evaporated with a rotary evaporator. The dried residues were kept at -20 °C.

Effect of cinnamaldehyde, cinnamic acid, and eugenol on the glucose levels

The three components purified by HPLC were dissolved in methanol to obtain standard solutions (1 mg/mL). Different volumes were taken and the solvent (methanol) was evaporated. Human plasma and/or Glucose-HSA solutions were then added.

The final concentrations of the components varied from 10 to 250 μ M. After 10 minutes incubation at 37 °C, aliquots were taken from glucose-HSA and/or human plasma solution for glucose analysis.

In order to identify the mechanism by which cinnamaldehyde (10 to 250 μ M) could modify the glucose levels, a series of experiments were performed adding glucose from stock solution B (either diluted in phosphate buffer or in HSA denatured by heating or by urea) to tubes containing cinnamaldehyde.

Fluorescence spectroscopy measurements

The fluorescence emission spectra were carried out on a spectrofluorimeter (Thermo Spectronic, Aminco. Bowman Series 2, USA) at 25 ± 0.1 °C. The slits were set at 3 and 5 nm for excitation and emission respectively. The pathlength of the sample cuvette was 1 cm.

Aliquots from cinnamaldehyde stock solution were taken, and the solvent was evaporated. A fixed volume (5.0 mL) of HSA solution was added. The molar ratios cinnamaldehyde/HSA were 0.5; 2.5; 5 and 10.

The fluorescence was recorded in the wavelength range 300–500 nm after exciting the protein solution either at 295 nm exclusively for tryptophan fluorescence or at 280 nm for total protein fluorescence.

Glucose binding

Aliquots from cinnamaldehyde stock solution were taken, and the solvent was evaporated. A fixed volume (5.0 mL) of HSA solution was added. The molar ratio cinnamaldehyde/HSA was equal to 1. Aliquots from glucose solution (Stock B) were then added. 30 minutes later, the fluorescence was recorded in the wavelength range 300–500 nm after exciting the glucose-albumin complex at 295 nm.

The data were plotted as relative fluorescence against glucose/albumin molar ratio.

Statistical analysis

All values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of n independent experiments. Data were analyzed by use of Mann-Whitney test. P < 0.05 was considered significant.

RESULTS

In the present study, data of 28 individuals were used, including 17 (60.7%) men (mean age 44 ± 13 years) and 11 (39.3%) women (mean age 45 ± 12 years). The characteristics of the studied population are presented in Table 1.

Table 1

Clinical characteristics of the study population. Data are shown as mean \pm standard deviation (SD) unless stated otherwise

Variable	Men (n=17)	Women (n=11)	p value*
Age (years)	44 \pm 13	45 \pm 12	0.002
Weight (kg)	85.6 \pm 13.1	71.6 \pm 12.5	<0.001
BMI (m/kg ²)	27.1 \pm 2.8	25.3 \pm 4.4	<0.001
Fasting blood glucose (g/L)			
Subjects with normal glycemia	0.99 \pm 0.01	1.02 \pm 0.02	<0.001
Subjects with hypoglycemia	0.65 \pm 0.01	0.65 \pm 0.01	<0.001
Subjects with Type 2 diabetes	1.41 \pm 0.01	1.43 \pm 0.01	<0.001
Type 2 diabetes (%)	29.4	36.4	<0.001
Diabetes duration (years)	9.8 \pm 4.7	6.8 \pm 5.2	<0.001

*p value for the comparison between men and women

Effect of cinnamon on the glucose levels

As shown in Figure 1, cinnamon decreased the concentration of glucose in glucose–HSA solution and human plasma. Cinnamon acted in a dose-dependent manner.

Effect of cinnamaldehyde, cinnamic acid, and eugenol on the glucose levels

As shown in Figure 2, cinnamaldehyde and cinnamic acid decreased the concentration of glucose in glucose–HSA solution (Figure 2a) and human plasma (with normal glucose concentration) (Figure 2b) while eugenol was non-effective even at 100 μM. The decrease was

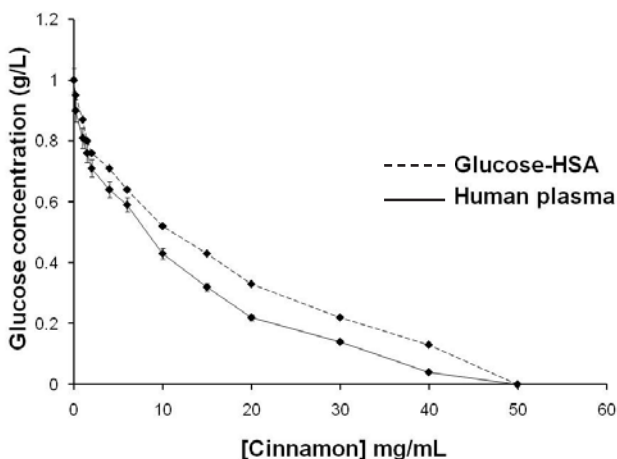
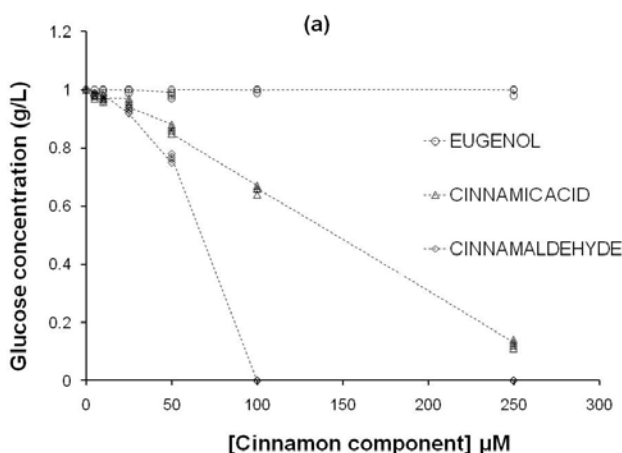


Figure 1
Effect of different concentrations of cinnamon on glucose levels in glucose-HSA solution (dashed line) and human plasma (solid line). Values are the means ± SEM of triplicate experiments. The SEM are presented but at some concentrations they are too small to be appreciated.



more important with cinnamaldehyde than with cinnamic acid, but both acted in a dose-dependent manner.

With cinnamaldehyde 100 μM, the glucose concentrations in the HSA-Glucose solution and in the human plasma were close to zero, whereas, for the same concentration of cinnamic acid, they were 0.65± 0.01 and 0.60±0.02, respectively.

Since cinnamaldehyde induced the strongest effects, it was chosen for the subsequent experiments.

The presence of cinnamaldehyde (100 μM) decreased the absorbance values of glucose in a medium containing native HSA (580 μM, pH 7.4, 37 °C). These values were respectively 0.042±0.001 and 0.001±0.001 in the absence and presence of cinnamaldehyde.

However, in the absence of HSA, the same concentration of cinnamaldehyde had no effect on glucose levels. Since the effect of cinnamaldehyde on glucose is dependent on the presence of HSA, the effect of cinnamaldehyde (50 μM) at different HSA concentrations (0; 18; 36; 72; 145; 290; 580 μM) was studied. Results indicate that the effect of cinnamaldehyde on decreasing glucose concentration is strictly dependent on the concentration of serum albumin in the medium.

Similar results were obtained when human plasma was used; 100 μM cinnamaldehyde reduced glucose concentrations both in hyperglycemic plasma (from 1.42 ±0.02 to 1.06±0.02 mg/L) and in hypoglycemic plasma (from 0.65±0.01 to close to zero).

Fluorescence spectroscopy measurements

To understand the mechanism linking cinnamaldehyde to HSA, fluorescence emission spectra were carried out on a spectrofluorimeter. Cinnamaldehyde had no intrinsic fluorescence at the excitation wavelengths of 280 or 295 nm.

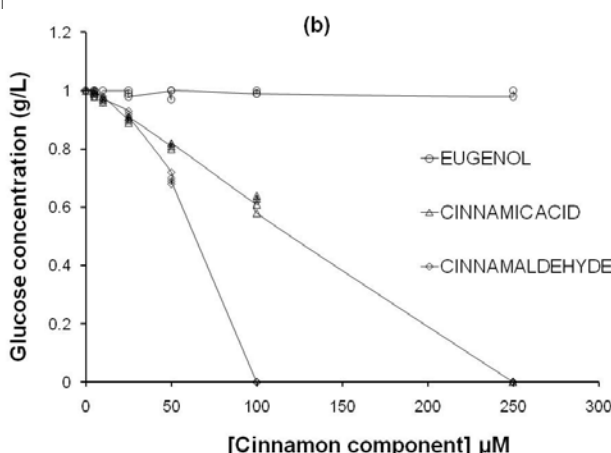


Figure 2
Effect of different concentrations of cinnamaldehyde, cinnamic acid and eugenol on glucose levels in glucose-HSA solution (panel A) and human plasma (panel B) from healthy subjects with normal glycemia (n=13). Values are the means ± SEM of triplicate experiments.

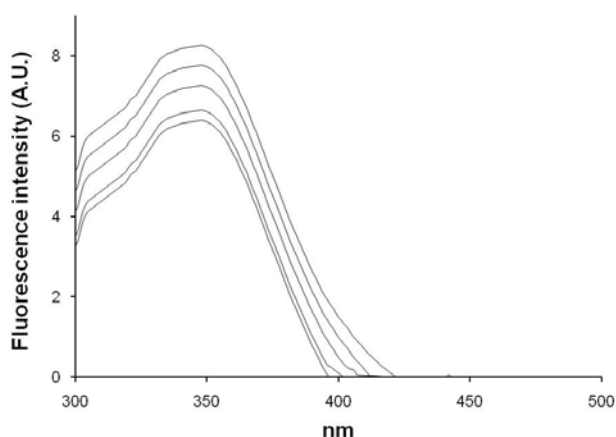


Figure 3

Effect of cinnamaldehyde on the intrinsic fluorescence of human serum albumin ($10 \mu\text{M}$) at pH 7.4. The protein was excited at 280 nm. The cinnamaldehyde concentration of the curves from bottom to top were 0; 5; 25; 50 and $100 \mu\text{M}$. Each data point was the average of three independent determinations.

Figure 3 shows the fluorescence emission spectra of HSA determined in the presence and absence of cinnamaldehyde after excitation at 280 nm. We can see that the fluorescence intensity of HSA increased with the cinnamaldehyde concentration.

When a mixture of glucose and HSA was excited at 295 nm, a fluorescence band appeared in the wavelength region 300–400 nm with an emission maximum at 350 nm. This magnitude of fluorescence intensity at 350 nm increased with glucose/albumin molar ratio as shown in Figure 4.

Whatever the glucose/albumin molar ratio, the addition of cinnamaldehyde to HSA at a molar ratio 1:1 produced an increase in the magnitude of fluorescence intensity at 350 nm.

DISCUSSION

Our results suggest that cinnamaldehyde and cinnamic acid produce modifications in the levels of glucose in a medium containing HSA. Since cinnamon powder obtained from the inner bark of *C. verum* contains cinnamaldehyde, cinnamic acid, and eugenol (14, 15), our results seem to demonstrate that the activity of cinnamon may be at least in part induced by cinnamaldehyde and cinnamic acid.

Because cinnamaldehyde was more efficient in decreasing glucose levels, we have been interested in determining its mechanism of action. When albumin was absent, cinnamaldehyde did not affect the glucose levels. This result has been found in several experiments and at various concentrations of cinnamaldehyde, varying from 5 to $250 \mu\text{M}$ (data not shown).

In HSA solutions (pH 7.4), the binding of glucose increased with HSA concentration. The intensity of the effect of cinnamaldehyde was related to the amount of albumin molecules, suggesting that albumin is involved in the mechanism of action of cinnamaldehyde.

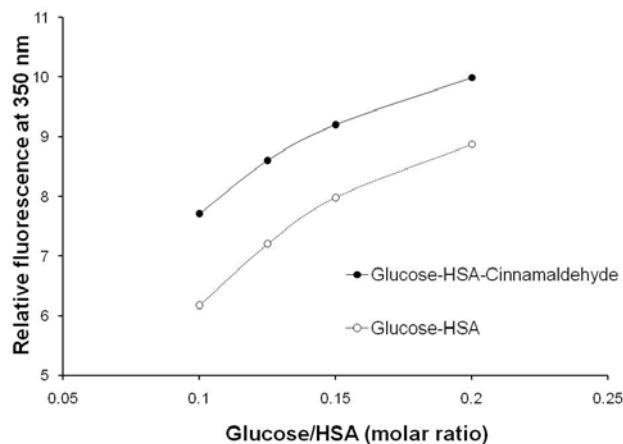


Figure 4

Relative fluorescence of glucose bound to human serum albumin in the presence (solid circles) and absence (open circles) of cinnamaldehyde ($10 \mu\text{M}$). The fluorescence was recorded at 350 nm after exciting the glucose–albumin complex at 295 nm.

The denaturation of HSA by heating at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ or exposing it to urea suppressed this activity. Really, when HSA was denatured, cinnamaldehyde was inactive. The results suggest that native structure of albumin is required so that cinnamaldehyde could produce a decrease in the glucose levels; it can be postulated that cinnamaldehyde produces a modification in the structure of albumin in such a way that allows glucose to better bind the protein.

The present work demonstrates that more glucose binds to albumin in presence of cinnamaldehyde and cinnamic acid. Based on these results, we can reasonably expect that the concentration of glycosylated HSA should be increased in these samples. Glycation involves the non-enzymatic addition of reducing sugars and/or their reactive degradation products to amine groups on proteins. This process is promoted by the presence of elevated blood glucose concentrations and occurs with various proteins that include HSA (27). The process of glycation has been found to have possible effects on both the structure and function of HSA (33, 34). For instance, several reports have found altered drug binding with this protein as a result of glycation (34–38). Given the importance of HSA and the relatively complex nature of glycation, it could be anticipated that the measurement of glycosylated HSA in plasma incubated with cinnamaldehyde or cinnamic acid, and the investigation of the effects of glycation on the binding of HSA with cinnamaldehyde or cinnamic acid, could help in understanding the potential clinical significance of these effects.

The fluorescence of HSA depends on the presence of the tryptophan, tyrosine and phenylalanine residues. Actually, the intrinsic fluorescence of HSA is almost contributed by tryptophan alone, because phenylalanine has a very low quantum yield and the fluorescence of tyrosine is almost totally quenched if it is ionized or near an amino group, a carboxyl group, or a tryptophan. This

view-point was well supported by the experimental observations of Sulkowska A et al (39). The change of intrinsic fluorescence intensity of HSA is that of the tryptophan residue when molecules are bound to HSA. Cinnamaldehyde increased the fluorescence of albumin either after excitation of the tryptophan alone or of the intact protein. Since HSA contains only one tryptophan residue (Trp-214), which resides in domain-II, the increase in fluorescence intensity observed after exciting the protein at 295 nm may be ascribed to the conformational changes in domain-II.

Glucose interacts with domain II-A and III-A of albumin. The increase in glucose binding to HSA caused by cinnamaldehyde cannot be due to non-specific interaction of cinnamaldehyde with glucose as no fluorescence was observed with free glucose mixed with cinnamaldehyde. A significant increase in glucose fluorescence due to cinnamaldehyde suggests that domain II A and/or domain III A, implied in the binding of glucose, undergo rearrangement altering their binding efficacy.

Results obtained in plasma from subjects presenting hyperglycemia or hypoglycemia incubated with cinnamaldehyde (100 μ M) show that cinnamaldehyde has a greater effect at a low plasma glucose levels.

The comparison of glucose concentration determined respectively in glucose–HSA solution and plasma of healthy subjects showed that cinnamaldehyde decreased glucose levels in plasma better than in glucose–HSA solutions. The difference between plasma and glucose–HSA solution was not related to difference in HSA concentration which was very similar in the two types of samples. The presence of endogenous compounds in plasma, especially those that can affect the binding of glucose, could explain, at least in part, the difference between the results obtained in glucose–HSA solution and those found in plasma.

In conclusion, we demonstrated that cinnamaldehyde and cinnamic acid interact with HSA increasing the binding of glucose to the protein. Based on fluorescence spectral results it can be concluded that the cinnamaldehyde produced rearrangement in domain II leading to an increase in the hydrophobic microenvironment of tryptophan and to the binding of glucose to protein. Since eugenol did not modify the binding of glucose, it could be considered less capable to affect the interaction of small molecules with albumin than cinnamaldehyde and cinnamic acid.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor H. Greige-Gerges for technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Thangaselvabai T, Prem Joshua J, Jayasekar M. Cinnamon (*Cinnamomum verum* presl) – The sweet bark spice for flavor and fragrance – A review. *Agric Rev* 2009;30:167-75.
2. Singh G, Maurya S, Catalan C. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1650-61.
3. Ranasinghe P, Galappaththy P. Health benefits of Ceylon cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a summary of the current evidence. *Ceylon Med J* 2016;61:1-5.
4. Gruenwald J, Freder J, Armbruester N. Cinnamon and Health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010;50:822-34.
5. Jakhethia V, Patel R, Khatri P, et al. Cinnamon: A pharmacological review. *J Adv Sci Res* 2010;1:19-23.
6. Nahas R, Moher M. Complementary and alternative medicine for the treatment of type 2 diabetes. *Can Fam Physician* 2009;55:591–6.
7. Qin B, Nagasaki M, Ren M, et al. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates *in vivo* insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;62:139-48.
8. Mang B, Wolters M, Schmitt B, et al. Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA1c, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur J Clin Invest* 2006;36:340–4.
9. Khan M, Safdar M, Ali Khan Mm, et al. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:3215-8.
10. Costello RB, Dwyer JT, Saldanha L, et al. Do Cinnamon supplements have a role in glycemic control in type 2 diabetes? A narrative review. *J Acad Nutr Diet* 2016;116:1794-802.
11. Berrio Lf, Polansky MM, Anderson R. Insulin activity: Stimulatory of cinnamon and brewer's yeast as influenced by albumin. *Horm Res* 1992;37:225-9.
12. Hasanzade F, Toliat M, Ahmad Emami S, et al. The Effect of cinnamon on glucose of type II diabetes patients. *J Tradit Complement Med* 2013;3:171–4.
13. Baker WL, Gutierrez –Williams G, Mickael White C, et al. Effect of cinnamon on glucose control and lipid parameters. *Diabetes Care* 2008;31:41-3.
14. Lee J, Gu Lee D, Yeon Park J, et al. Analysis of the trans-cinnamic acid content in *Cinnamomum* spp. and commercial cinnamon powder using HPLC. *J Agric Chem Environ* 2015;4:102-8.
15. Li Y-q, Kong D-X, Wu H. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind Crops Prod* 2013;41:269-78.
16. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/642942> (last visited: January 2018).
17. Nikzamir A, Palangi A, Kheirollaha A, et al. Expression of glucose transporter 4 (GLUT4) is increased by cinnamaldehyde in C2C12 mouse muscle cells. *Iran Red Crescent Med J* 2014;16:1-5.
18. Paranagama PA, Wimalasena S, Jayatilake GS, et al. A comparison of essential oil constituents of bark, leaf, root and fruit of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* blum) grown in Sri Lanka. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka* 2001;29:147-53.
19. Kong X, Liu X, Li J, et al. Advances in pharmacological research of eugenol. *Curr Opin Complement Alternat Med* 2014;1:8-11.
20. Pavithra B. Eugenol-A review. *J Pharm Sci Res* 2014;6:153-4.

21. Letizia CS, Cocchiara J, Lapczynski A, et al. Fragrance material review on cinnamic acid. *Food Chem Toxicol* 2005;43:925-43.
22. Guzman JD. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules* 2014;19:19292-349.
23. Sova M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:749-67.
24. Fanali G, di Masi A, Trezza V, et al. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* 2012;33:209-90.
25. Lefèvre P, Badetti C. Metabolism of albumin. *Ann Fr Anesth Reanim* 1996;15:464-9.
26. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 2005;353:38-52.
27. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 2013;425:64-76.
28. Ahmed N, Dobler D, Dean M, et al. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J Biol Chem* 2005;280:5724-32.
29. Bian H, Zhang H, Yu Q, et al. Studies on the interaction of cinnamic acid with bovine serum albumin. *Chem Pharm Bull* 2007;55:871-5.
30. Weibel H, Hansen J. Interaction of cinnamaldehyde (a sensitizer in fragrance) with protein. *Contact Dermatitis* 1989;20:161-6.
31. Benedict SR. The determination of blood sugar. *J Biol Chem* 1925;64:207-13.
32. Ahmad B, Khan MK, Haq SK, et al. Intermediate formation at lower urea concentration in 'B' isomer of human serum albumin: a case study using domain specific ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:166-73.
33. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 1984;259:3812-7.
34. Nakajou K, Watanabe H, Kragh-Hansen U, et al. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim Biophys Acta* 2003;1623:88-97.
35. Joseph KS, Anguizola J, Jackson AJ, et al. Chromatographic analysis of acetoheamide binding to glycated human serum albumin. *J Chromatogr B* 2010;878:2775-81.
36. Joseph KS, Anguizola J, Hage DS. Binding of tolbutamide to glycated human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* 2011;54:426-32.
37. Joseph KS, Hage DS. The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan. *J Pharm Biomed Anal* 2010;53:811-8.
38. Matsuda R, Anguizola J, Joseph KS, et al. High-performance affinity chromatography and the analysis of drug interactions with modified proteins: binding of gliclazide with glycated human serum albumin. *Anal Bioanal Chem* 2011;401:2811-9.
39. Sulkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *J Mol Struct* 2002;614:227-32.

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

Sabrina Buoro¹, Paola Pezzati², Pier Aldo Canessa³, Stefano Gasparini⁴, Gaetano Bernardi⁵, Michela Seghezzi¹,
Marcello Ciaccio⁶, Giuseppe Lippi⁷

¹Unità Operativa Complessa SMel2 Analisi Chimico Cliniche, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

²Centro Regionale di Riferimento, Struttura Organizzata Dipartimentale Sicurezza e Qualità, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze

³Divisione di Pneumologia, Azienda Sanitaria Locale 5, La Spezia

⁴Università Politecnica delle Marche, Ancona

⁵Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

⁶Sezione di Biochimica Clinica e Medicina Molecolare Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Unità Operativa Complessa e Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Palermo

⁷Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale Universitario di Verona

ABSTRACT

Results of a survey produced by the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC) and the Italian Association of Hospital Pneumologists (AIPO) concerning pleural fluid analysis. The aim of this paper is to present the preliminary results of a joint project by SIBioC-AIPO working group on "Body cavities fluids". The main purpose of the working group is to achieve a harmonized and shared diagnostic pathway related to pleural fluid (PF) analysis. The multistep project begins with a state of the art analysis. A survey, sent to both laboratory medicine personnel and pneumologists, was conducted between October and December 2016. The questionnaire (21 questions) was made available through the web-based SurveyMonkey platform. Overall, 408 replies were collected, 40.4% from laboratory medicine specialists, 3.2% from laboratory technicians, 49.3% from pneumologists and 7.1% from professionals with non-specified qualification. Regarding the pre-analytical phase, the most critical issue resulted to be the clinical query, due to the lack of structured communication between clinicians and laboratory personnel. While over 76% of laboratory professionals stated that the working diagnosis was unavailable, 87% of pneumologists affirmed that the clinical question had been forwarded to the laboratory. An important issue was the widespread use of inappropriate containers for PF collection (60% of inappropriate tubes). Regarding the panel of tests, a satisfactory agreement was reached on the need to perform macroscopic analysis and cytometric evaluation, along with the assessment of pH, glucose, total proteins, lactate dehydrogenase and the respective ratios between PF and serum concentrations. As expected, the availability of verified or validated analytical methods, notably pH analysis, has emerged as a critical point. The layout of the laboratory report also needs improvements and better harmonization. Despite the many critical issues emerged from this survey, a positive feedback was reflected by a notable general interest on PF analysis, leading thus the way to produce a joint consensus document involving clinicians and laboratory personnel, as suggested by more than 30% of responders.

INTRODUZIONE

La cavità pleurica è uno spazio virtuale compreso tra mesotelio della pleura parietale e viscerale, contenente

un film liquido, detto liquido pleurico (LP), con la funzione di facilitare i movimenti di scorrimento tra le due membrane.

Un aumento dello spazio all'interno della cavità

*Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica* e *Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio*.

Corrispondenza a: Buoro Sabrina, UOC SMel2 Analisi Chimico Cliniche, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS 1, Bergamo 24127. Tel. 0352674550, fax 0352674939, e-mail sbuoro@asst-pg23.it

Ricevuto: 12.01.2018

Revisionato: 04.03.2018

Accettato: 08.03.2018

Publicato on-line: 05.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.022

pleurica, essenzialmente sostenuto dalla presenza di un versamento, può essere dovuto a vari meccanismi, tra i quali iperproduzione di liquido, alterazione del microcircolo capillare e ridotto riassorbimento. In sintesi, le condizioni più comuni che possono causare versamento pleurico sono riconducibili a insufficienza cardiaca, infezioni, infiammazioni pleuriche, neoplasie (es. mesotelioma, tumori primitivi o secondari del polmone), tubercolosi ed embolia polmonare.

L'esame del LP, piuttosto articolato e complesso, è convenzionalmente richiesto per indagare l'eziologia del versamento cavitario (1-13). La classificazione in essudato, trasudato e versamento chiloso è infatti uno degli obiettivi prioritari del percorso diagnostico, in quanto la natura chimico-fisica del campione riflette differenti aspetti fisiopatologici e indirizza quindi verso la possibile *noxa* associata al versamento stesso. L'essudato può formarsi per aumento della permeabilità capillare o diminuzione del riassorbimento linfatico, mentre il trasudato si genera solitamente in seguito ad aumento della pressione idrostatica o diminuzione della pressione oncotica. Infine, il versamento chiloso può originare come conseguenza di traumi o neoplasie, solitamente linfomi, che coinvolgono il dotto toracico.

Le indicazioni sul tipo di indagini di laboratorio da eseguire e sui metodi analitici da adottare, tuttavia, sono tuttora controverse (3, 11-13).

Alla luce dell'importanza che l'analisi dei liquidi cavitari oggi riveste, la collaborazione tra medicina di laboratorio e discipline cliniche è essenziale, poiché è finalizzata a definire, nell'ambito delle fasi preanalitica, analitica e post analitica, procedure e tecniche che garantiscano informazioni idonee a indirizzare un corretto processo decisionale clinico. Sulla base di queste considerazioni, il Gruppo di Studio SIBioC "Liquidi Cavitari" (GdS-LC) e l'Associazione Italiana di Pneumologi Ospedalieri (AIPO), hanno ritenuto opportuno stabilire una collaborazione per arrivare a una definizione standardizzata e condivisa di appropriatezza nell'impiego diagnostico della matrice LP.

La visione attuale delle attività sanitarie, anche di tipo diagnostico e prognostico, esige una stretta integrazione tra un elevato grado di qualità metodologica nelle prestazioni effettuate e l'evidenza delle possibili ricadute cliniche sugli esiti (1-3, 9, 11-14). In quest'ottica, la gestione del LP rappresenta un ambito ideale per l'applicazione di tali fondamenti.

I fattori che compongono lo scenario clinico sono molteplici, e includono le patologie menzionate in precedenza (1-13). E' anche lecito supporre che l'incidenza di queste patologie tenderà ad aumentare progressivamente, in parallelo con l'invecchiamento della popolazione e con l'aumento della sopravvivenza dei pazienti con patologie croniche. In alcune situazioni cliniche, la composizione del LP assume valore patognomonico e nella maggior parte dei casi costituisce comunque un punto di partenza per algoritmi diagnostici anche complessi (1-13). Le problematiche tecniche legate alla specifica matrice, la mancata validazione e standardizzazione dei metodi di misura a essa applicati,

nonché l'arbitrarietà dei pannelli analitici proposti o richiesti sul LP, costituiscono importanti criticità.

Il progetto del gruppo di lavoro intersocietario, basato su un approccio sistematico, inizia dalla ricognizione dello stato dell'arte, i cui risultati sono illustrati in questo articolo, che costituirà la base di partenza per la proposta di un documento di indirizzo condiviso.

MATERIALI E METODI

È stato predisposto un questionario composto da 21 quesiti, 17 dei quali comuni sia a laboratoristi (specialisti di medicina di laboratorio e tecnici sanitari di laboratorio biomedico) sia a pneumologi, mentre 4 quesiti erano specifici per laboratoristi e facoltativi per gli pneumologi.

Nel questionario sono state previste sia risposte di tipo chiuso, che aperto (testo libero). I quesiti sono stati raggruppati in quattro sezioni: informazioni anagrafiche relative al soggetto che compila il questionario (3 quesiti); informazioni di natura organizzativa e relative alla fase pre-analitica (9 quesiti); informazioni sulla fase analitica (4 quesiti), facoltative per i pneumologi; e informazioni relative alla fase post-analitica, soprattutto riguardanti la refertazione (5 quesiti).

Il questionario è stato predisposto sulla piattaforma SurveyMonkey™ (SurveyMonkey Software, SurveyMonkey Inc., USA) Il link per la compilazione online del questionario è stato inviato a tutti i soci SIBioC e AIPO; a tutti i partecipanti è stato garantito l'anonimato. L'elaborazione dei dati è stata eseguita con i software gestionali SurveyMonkey™ (SurveyMonkey Software, SurveyMonkey Inc. USA) e Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Leeds, UK). È stata effettuata un'analisi statistica descrittiva, mediante utilizzo del test chi-quadro di Pearson (χ^2). Il valore di significatività statistica è stato fissato a $<0,05$. Il test del chi-quadro di Pearson è stato applicato su valori assoluti e frequenze assolute, mentre nei risultati, per rendere la lettura più immediata, le frequenze assolute sono state trasformate in frequenze relative.

RISULTATI

Al questionario online hanno partecipato 408 professionisti, 165 (40,4%) specialisti di medicina di laboratorio (SML), 13 (3,2%) tecnici sanitari di laboratorio biomedico (TSLB), 201 (49,3%) pneumologi e 29 (7,1%) operatori che non hanno dichiarato la qualifica professionale (QND). Prima di procedere alla analisi dei dati è stata eseguita una verifica sulla completezza di compilazione, che ha portato all'esclusione di 104 questionari poiché i partecipanti non avevano risposto a nessun quesito o solo ai primi due (qualifica e/o regione di appartenenza). Le categorie SML e TSLB, alla luce del numero esiguo di quest'ultima, sono state accorpate in un'unica categoria denominata laboratoristi.

L'analisi dei dati è quindi effettuata su 304 questionari, 149 (49%) dei quali compilati da pneumologi, 131 (43%) da laboratoristi e 24 (8%) da

Tabella 1

Dati complessivi relativi alle risposte ottenute

	Numero complessivo	Laboratorista	Pneumologo	Qualifica professionale non dichiarata
Numero risposte totali	20064	8646 (43,1%)	9843 (49,0%)	1593 (7,9%)
Numero di risposte non compilate	3552 (17,7%)	1738 (20,1%)	1423 (14,5%)	391 (24,7%)
Numero di risposte "non lo so"	972 (4,8%)	362 (4,2%)	446 (4,5%)	82 (5,2%)
Numero di questionari compilati interamente	131 (43,0%)	46 (35,1%)	75 (57,3%)	11 (7,7%)

QND. Solo poco più di un terzo dei questionari (131/304) riporta risposte a tutte le domande. In Tabella 1 sono riassunti alcuni dati sulla compilazione del questionario.

Per quanto riguarda la distribuzione geografica, sono risultate rappresentate tutte le aree geografiche nazionali, mantenendo la proporzione per le qualifiche sopra descritte, come di seguito riportato: regioni del nord, 150 partecipanti (49,3%); regioni del centro, 78 partecipanti (25,7%); regioni del sud, 50 partecipanti (16,4%); Italia insulare, 21 partecipanti (6,9%); area geografica non dichiarata, 5 partecipanti (1,6%).

In Figura 1 è rappresentata la distribuzione dei partecipanti in funzione della numerosità di analisi di LP eseguite annualmente.

Parte organizzativa e pre-analitica

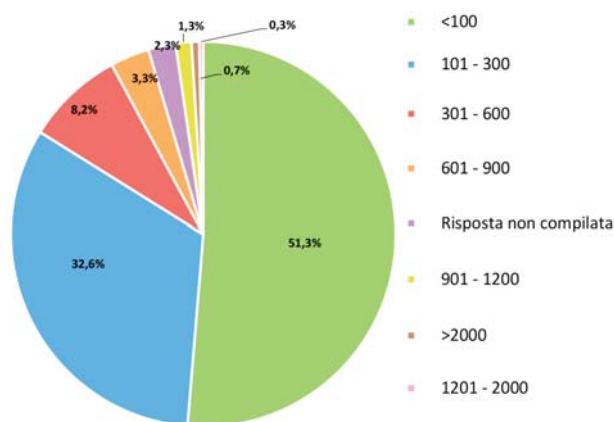
I risultati del questionario relativi alla parte organizzativa sono riportati in dettaglio nelle Tabelle 2 e 3.

Di particolare interesse appaiono le risposte alla domanda "La richiesta di esame di Liquido Pleurico è accompagnata dal quesito clinico?" (Tabella 2), che evidenziano una probabile criticità nella comunicazione. Il 76,3% dei laboratoristi dichiara infatti che il quesito clinico non è disponibile, mentre 86,6% dei pneumologi dichiara il contrario.

Per i quesiti: "Esiste una procedura concordata fra Unità Cliniche e Laboratorio per la raccolta, la conservazione, l'invio e l'analisi dei campioni?" e "Motivazioni per cui viene richiesta l'analisi del Liquido Pleurico" si osserva una sostanziale concordanza fra le risposte, indipendentemente dal profilo professionale. Alla prima domanda il 47% di risposte conferma infatti la disponibilità di una procedura e, per la seconda domanda, il 61,8% conferma che l'obiettivo principale della analisi del LP è la diagnosi differenziale fra essudato, trasudato e altro versamento.

I contenitori maggiormente utilizzati per raccogliere e inviare il LP al laboratorio sono risultati essere contenitore sterile senza additivi (34,5%) per gli esami di biochimica e immunometria, provetta con anticoagulante EDTA (39,5%) per l'esame citometrico e contenitore sterile per emocoltura (13,2%) per l'esame colturale.

I campioni di LP per esame colturale e per biologia molecolare mirata alla ricerca di *Mycobacterium*

**Figura 1**

Distribuzione dei partecipanti in funzione della numerosità di analisi di liquido pleurico eseguite annualmente.

tuberculosis complex, sono raccolti in contenitore sterile, senza additivi, nel 65,8% e 56,9%, dei casi rispettivamente.

Pannello di analisi

I risultati dei quesiti relativi agli analiti richiesti su LP sono descritti nel dettaglio in Tabella 4. Per la maggioranza dei partecipanti al questionario, gli esami che dovrebbero essere eseguiti sempre, ovvero ogni qualvolta sia necessario valutare la composizione del liquido stesso, comprendono la determinazione delle proteine totali, del glucosio e della lattico deidrogenasi (LDH), il pH, l'esame citometrico, la valutazione macroscopica e l'esame citologico. E' evidente un'elevata concordanza fra pneumologi, laboratoristi e QND, caratterizzata da $p > 0,05$ al test χ^2 test (Tabella 4) per la determinazione delle proteine totali, per l'esame citometrico e per l'analisi macroscopica.

Per quanto riguarda la determinazione di trigliceridi, colesterolo e lipasi, la risposta prevalente è che questi esami dovrebbero essere richiesti solo in specifiche condizioni cliniche, previo accordo (Tabella 4). Per la richiesta di amilasi si registrano invece delle difformità, giacché i partecipanti indicano, in uguale proporzione, la

Tabella 2*Fase pre-pre e pre-analitica*

Risposte	Numero (%) (304 questionari)	Pneumologi (149/304)	Laboratoriisti (131/304)	Qualifica professionale non dichiarata (24/304)
Quesito: La richiesta di esame di Liquido Pleurico è accompagnata dal quesito clinico?				
SI	167 (55,0%)	129 (86,6%)	27 (20,6%)	11 (45,8%)
NO	129 (42,4%)	19 (12,8%)	100 (76,3%)	10 (41,7%)
Non compilata	8 (2,6%)	1 (0,7%)	4 (3,1%)	3 (12,5%)
Quesito: Motivazioni per cui viene richiesta l'analisi del Liquido Pleurico				
Diagnosi differenziale fra essudato, trasudato e altro versamento	188 (61,8%)	123 (82,6%)	56 (42,7%)	9 (37,5%)
Diagnosi differenziale fra essudato e trasudato	30 (9,9%)	3 (2,0%)	23 (17,6%)	4 (16,7%)
Non lo so	42 (13,8%)	2 (1,3%)	37 (28,2%)	3 (12,5%)
Altro	36 (11,9%)	20 (13,4%)	11 (8,4%)	5 (20,8%)
Risposta non compilata	8 (2,6%)	1 (0,7%)	4 (3,1%)	3 (12,5%)
Quesito: Il pannello di esami effettuati sul Liquido Pleurico è stato stabilito da:				
Clinico	74 (24,0%)	62 (41,6%)	8 (6,1%)	3 (12,5%)
Specialista di medicina di laboratorio	59 (19,4%)	16 (10,7%)	41 (31,3%)	2 (8,3%)
Protocollo concordato fra laboratorio e clinica	116 (38,2%)	47 (31,5%)	60 (45,8%)	9 (37,5%)
Non è definito un pannello di esami standard	33 (10,9%)	17 (11,4%)	12 (9,2%)	4 (16,7%)
Risposta non compilata	22 (7,2%)	7 (4,7%)	10 (7,6%)	5 (20,8%)
Quesito: Esiste una procedura concordata fra Unità Cliniche e Laboratorio per la raccolta, la conservazione, l'invio e l'analisi dei campioni?				
Esiste una procedura codificata, ma solo del laboratorio	72 (23,7%)	24 (16,1%)	47 (35,9%)	1 (4,2%)
SI	143 (47,0%)	85 (57,0%)	44 (33,6%)	14 (58,3%)
NO	55 (18,1%)	25 (16,8%)	26 (19,8%)	4 (16,7%)
Non lo so	21 (6,9%)	10 (6,7%)	9 (6,9%)	2 (8,3%)
Risposta non compilata	13 (4,3%)	5 (3,4%)	5 (3,8%)	3 (12,5%)
Quesito: Per esami biochimici/immunometrici in quale tipo di provette viene raccolto il campione di liquido pleurico?				
Con anticoagulante EDTA	45 (14,8%)	31 (20,8%)	10 (7,6%)	4 (16,7%)
Con altro anticoagulante	18 (5,9%)	3 (2,0%)	11 (8,4%)	4 (16,7%)
Con gel separatore	22 (7,2%)	7 (4,7%)	14 (10,7%)	1 (4,2%)
Senza additivi, sterile	105 (34,5%)	55 (36,9%)	46 (35,1%)	4 (16,7%)
Senza additivi	77 (25,3%)	35 (23,5%)	36 (27,5%)	6 (25,0%)
Risposta non compilata	37 (12,2%)	18 (12,1%)	14 (10,7%)	5 (20,8%)
Quesito: Per l'esame citometrico completo (con differenziazione cellulare) in quale tipo di provette viene raccolto il campione di Liquido Pleurico?				
Con anticoagulante EDTA	120 (39,5%)	44 (29,5%)	69 (52,7%)	7 (29,2%)
Con altro anticoagulante	14 (4,6%)	10 (6,7%)	4 (3,1%)	0
Con gel separatore	4 (1,3%)	3 (2,0%)	1 (0,8%)	0
Senza additivi, sterile	60 (19,7%)	34 (22,8%)	22 (18,8%)	4 (16,7%)
Senza additivi	51 (16,8%)	32 (21,3%)	15 (11,5%)	4 (16,7%)
Risposta non compilata	55 (18,1%)	26 (17,4%)	20 (15,3%)	9 (37,5%)

Tabella 3

Fase pre-analitica per ricerche microbiologiche e citologiche

Risposte	Numero (%) (304 questionari)	Pneumologi (149/304)	Laboratoristi (131/304)	Qualifica professionale non dichiarata (24/304)
Quesito: Qualora sia richiesto l'esame microbiologico colturale, il campione viene inviato al laboratorio:				
In contenitore sterile senza additivi	199 (65,5%)	106 (71,1%)	80 (61,1%)	13 (54,2%)
Nel flacone per emocolture per batteri anaerobi	14 (4,3%)	7 (4,7%)	4 (3,1%)	2 (8,3%)
Nel flacone per emocolture per batteri aerobi	27 (8,9%)	20 (13,4%)	8 (5,3%)	0
Non lo so	38 (12,5%)	8 (5,4%)	26 (19,8%)	4 (16,7%)
Risposta non compilata	26 (8,6%)	8 (5,4%)	13 (9,9%)	5 (20,8%)
Quesito: Qualora sia richiesto l'esame colturale per <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> (BK)				
In contenitore sterile senza additivi	200 (65,8%)	126 (84,6%)	62 (47,3%)	12 (50,0%)
Nel flacone per emocolture per batteri aerobi	2 (0,7%)	2 (1,3%)	0	0
Non lo so	53 (17,4%)	10 (6,7%)	37 (28,2%)	6 (25,0%)
Risposta non compilata	49 (16,1%)	11 (7,4%)	32 (24,4%)	6 (25,0%)
Quesito: Per biologia molecolare mirata alla ricerca di <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> (BK)				
In contenitore sterile senza additivi	176 (56,9%)	113 (75,8%)	51 (38,9%)	9 (37,5%)
Non lo so	66 (21,7%)	18 (12,1%)	40 (30,5%)	8 (33,3%)
Risposta non compilata	65 (21,4%)	18 (12,1%)	40 (30,5%)	7 (29,2%)
Quesito: Qualora sia richiesto l'esame citologico il campione viene inviato al Laboratorio:				
In contenitore sterile senza additivi (qualche mL)	125 (41,1%)	73 (49,0%)	43 (32,8%)	9 (37,5%)
Nella sacca di raccolta (tutto il liquido drenato del versamento)	52 (17,1%)	40 (26,8%)	9 (6,9%)	3 (12,5%)
In altri contenitori specificare quali	38 (12,5%)	27 (18,1%)	10 (7,6%)	1 (4,2%)
Non lo so	59 (19,4%)	1 (0,7%)	52 (39,7%)	6 (25,0%)
Risposta non compilata	30 (9,9%)	8 (5,4%)	17 (13,0%)	5 (20,8%)

necessità di eseguire sempre l'esame oppure solo in particolari condizioni cliniche. Risposte simili si rilevano anche per l'esame microbiologico, per il quale il 47% dei partecipanti indica la necessità di esecuzione in qualsiasi condizione clinica, mentre il 30,3% indica che è necessario eseguirlo solo in casi selezionati.

Per i marcatori di neoplasia e per la creatinina, rispettivamente il 31,9% e il 38,8% dei partecipanti afferma che non è necessario eseguire sempre questi dosaggi, mentre il 29,6% e il 24,7%, rispettivamente, indica che è necessario eseguirli solo in casi selezionati.

I marcatori di neoplasia indicati da 63 (22,3%) partecipanti (12,7% QND, 38,1% laboratoristi e 49,2% pneumologi) sono antigene carcinoembrionario (CEA; 26,1%); enolasi neurone specifica (NSE; 19,1%); "cancer antigen 19-9" (CA19-9; 9,5%); "cytokeratin fragment CYFRA 21-1" (CYFRA 21,1; 8,9%); "cancer antigen 125" (CA125; 8,3%); antigene polipeptidico tissutale (TPA; 7,6%); alfafetoproteina (AFP; 5,7%); "cancer antigen 15-3" (CA15-3; 5,1%); antigene prostatico specifico (PSA; 1,3%); cromogranina (0,6%) e

altri (5,1%).

Di notevole interesse il dato relativo alle risposte sul calcolo dei rapporti di concentrazione tra LP e sangue venoso per le proteine totali e LDH. Il 37,8% e 37,2% dei partecipanti risponde che non devono essere richiesti sempre, mentre percentuali molto simili (38,5% e 37,2%) dichiarano l'opposto, ovvero che sono sempre necessari. La quasi totalità (80%) dei pneumologi che hanno risposto alla domanda è però concorde nel dichiarare che il calcolo del rapporto di concentrazione delle proteine totali sia sempre necessario. Il 51% dei partecipanti risponde che non è mai necessario il calcolo del rapporto del glucosio, così come il 55,6% (70% dei quali laboratoristi) risponde che non è necessario il calcolo del rapporto per il colesterolo. Il calcolo del gradiente di albumina è infine ritenuto inutile dal 57,2% dei partecipanti al questionario.

Fase analitica

I quesiti facoltativi sulla fase analitica sono stati compilati solo in parte (Tabella 5). L'analisi delle risposte

Tabella 4*Analiti di interesse*

Quesito: quali analisi/determinazioni sono previste per il Liquido Pleurico?

Analiti	Mai	Sempre	Dopo accordi specifici e motivati clinicamente	Non lo so	Risposta non compilata	χ^2 valore p
Glucosio	28 (9,2%)	195 (64,1%)*	43 (14,1%)	4 (1,3%)	34 (11,3%)	58,05 <0,0001
Proteine totali	4 (1,3%)	259 (85,2%)	13 (4,3%)	2 (0,7%)	26 (8,6%)	19,48 0,0776
Albumina	56 (18,4%)	104 (34,2%)*	73 (24,0%)	7 (2,3%)	64 (21,1%)	28,10 0,0053
Lattico deidrogenasi	10 (3,3%)	235 (77,3%)*	27 (8,9%)	3 (1,0%)	29 (9,5%)	35,36 0,0004
Trigliceridi	66 (21,7%)	28 (9,2%)	140 (46,1%)*	9 (3,0%)	61 (20,1%)	56,08 <0,0001
Colesterolo	65 (21,4%)	29 (9,5%)	136 (44,7%)*	10 (3,3%)	64 (21,1%)	53,86 <0,0001
Amilasi	49 (16,1%)	58 (19,1%)	127 (41,8%)*	10 (3,3%)	60 (19,7%)	24,75 0,0161
Lipasi	68 (22,4%)	19 (6,3%)	124 (40,8%)*	12 (3,9%)	81 (26,6%)	33,24 0,0009
pH	33 (10,9%)	178 (58,6%)*	38 (12,5%)	8 (2,6%)	47 (15,5%)	83,49 <0,0001
Creatinina	118 (38,8%)*	11 (3,6%)	75 (24,7%)	20 (6,6%)	80 (26,3%)	25,75 0,0117
Marcatori di neoplasia	97(31,9%)*	33 (10,9%)	90 (29,6%)*	16 (5,3%)	68 (22,4%)	60,67 <0,0001
Esame citometrico	25 (8,2%)	149 (49,0%)	50 (16,4%)	12 (3,9%)	68 (22,4%)	14,67 0,0659
Esame citometrico completo (con differenziazione cellulare)	32 (10,5%)	130 (42,8%)	83 (27,3%)	14 (4,6%)	45 (14,8%)	19,44 0,0785
Conteggio eritrociti	58 (19,1%)	92 (30,3%)*	70 (23,0%)	16 (5,3%)	68 (22,4%)	25,55 0,0124
Analisi macroscopica <small>include la descrizione dell'aspetto e del colore</small>	30 (9,9%)	201 (66,1%)	17 (5,6%)	6 (2,0%)	50 (16,4%)	11,05 0,5243
Esame citologico	12 (3,9%)	138(45,5%)*	69 (22,7%)	25 (8,2%)	60 (19,7%)	159,04 <0,0001
Esame microbiologico	7 (2,3%)	143 (47,0%)*	92 (30,3%)	15 (4,9%)	47 (15,5%)	91,70 <0,0001
Quesito: Quali dei seguenti parametri calcolati sono richiesti/refertati?						
Rapporto proteine totali	115 (37,8%)*	117 (38,5%)*	32 (10,5%)	7 (2,3%)	33 (10,9%)	95,17 <0,0001
Rapporto lattico deidrogenasi	113*(37,2%)	113 (37,2%)*	36 (11,8%)	9 (3,0%)	33 (10,9%)	116,99 <0,0001
Rapporto glucosio	155 (51,0%)	47 (15,5%)	51(16,8%)	10(3,3%)	41(13,5%)	93,51 <0,0001
Rapporto Colesterolo	169 (55,6%)*	7 (2,3%)	70 (23,0%)	14 (4,6%)	44 (14,5%)	71,53 <0,0001
Gradiente albumina	174 (57,2%)	21 (6,9%)	46 (15,1%)	15 (4,9%)	48 (15,8%)	88,54 <0,0001

*Rapporto: si riferisce al rapporto fra la concentrazione dell'analita nel liquido pleurico e nel siero.**Gradiente: si riferisce alla differenza di concentrazione tra siero e liquido pleurico.* *χ^2 valore p: sono riferiti al grado di concordanza fra pneumologi, laboratoristi e il gruppo con qualifica professionale non dichiarata; le celle in grigio denotano concordanza significativa di risposte fra le diverse figure professionali.***>50% dei pneumologi.****> del 50% dei laboratoristi.*****>70% dei pneumologi e >50% dei Laboratoristi.*

Tabella 5*Fase analitica: la compilazione era facoltativa per i pneumologi*

Risposte	Numero (%) (304 questionari)	Pneumologi (149/304)	Laboratoriisti (131/304)	Qualifica professionale non dichiarata (24/304)
Quesito: La determinazione del pH viene eseguita				
Al momento del prelievo, in reparto/ambulatorio	51 (16,8%)	48 (32,2%)	0	3 (12,5%)
In laboratorio con pH metro	28 (9,2%)	19 (12,8%)	8 (6,1%)	1 (4,2%)
In laboratorio con striscia reattiva o altro sistema	54 (17,8%)	3 (2,0%)	46 (36,6%)	3 (12,5%)
Non viene effettuata	38 (12,5%)	2 (1,3%)	32 (24,4%)	4 (16,7%)
Altro	11 (3,6%)	5 (3,4%)	4 (3,1%)	2 (8,3%)
Non lo so	10 (3,3%)	6 (4,0%)	4 (3,1%)	0
Risposta non compilata	112 (36,8%)	66 (44,3%)	35 (26,7%)	11 (45,8%)
Quesito: L'esame citometrico (conta e differenziazione cellulare) viene eseguito mediante				
Sistema automatizzato	68 (22,4%)	19 (12,8%)	45 (34,4%)	4 (16,7%)
Conteggio e/o differenziazione cellulare a fresco in microscopia ottica con camera di conta	11 (3,6%)	5 (3,4%)	6 (4,6%)	0
Conteggio cellulare a fresco in microscopia ottica con camera di conta e differenziazione cellulare su citocentrifuga	62,0%	3 (2,0%)	3 (2,3%)	0
Sempre con entrambi i metodi (microscopia ottica e automatizzato)	21 (6,9%)	1 (0,7%)	18 (13,7%)	2 (8,3%)
Screening con metodo di conta automatizzato e conferma in microscopia ottica	16 (5,3%)	1 (0,7%)	13 (9,9%)	2 (8,3%)
Screening con metodo di conta in microscopia ottica e conferma con metodo automatizzato	6 (2,0%)	1 (0,7%)	5 (3,8%)	0
Altro	4 (1,3%)	1(0,7%)	2 (1,5%)	1 (4,2%)
Non lo so	49 (16,1%)	42 (28,2%)	4 (3,1%)	3 (12,5%)
Risposta non compilata	123 (40,5%)	76 (51,0%)	35 (26,7%)	12 (50%)
Quesito: Se l'esame citometrico viene effettuato con metodo automatizzato, quale tipo di strumentazione viene utilizzata?				
Emocitometro con canale di analisi dedicato	45 (14,8%)	3 (2,0%)	37 (28,2%)	5 (20,8%)
Emocitometro senza canale di analisi dedicato	34 (11,2%)	2 (1,3%)	30 (22,9%)	2 (8,3%)
Sistema di analisi automatizzata del sedimento urinario	6 (2,0%)	0	6 (4,6%)	0
Citofluorimetro	12 (3,9%)	4 (2,7%)	8 (6,1%)	0
Altro	3 (1,0%)	0	2 (1,5%)	1 (4,2%)
Non lo so	63 (20,7%)	54 (36,2%)	6 (4,6%)	3 (12,6%)
Risposta non compilata	141 (46,4%)	86 (57,7%)	42 (32,1%)	13 (54,2%)
Quesito: Il metodo automatizzato per l'esame citometrico è stato validato e/o verificato per la matrice specifica?				
SI	70 (23,0%)	21 (14,3%)	43 (32,8%)	6 (25,0%)
NO	17 (5,6%)	2 (1,3%)	14 (10,7%)	1 (4,2%)
In parte	21 (6,9%)	0	20 (15,3%)	1 (4,2%)
Non lo so	61 (20,1%)	42 (28,2%)	14 (10,7%)	5 (4,2%)
Risposta non compilata	135 (44,4%)	84 (56,4%)	40 (30,5%)	11 (45,8%)
Quesito: Per gli esami biochimici/immunometrici (es, proteine totali, glucosio, lattico deidrogenasi) i metodi sono stati validati e/o verificati?				
SI	64 (21,1%)	19 (12,8%)	40 (30,5%)	5 (20,8%)
NO	19 (6,3%)	2 (1,3%)	15 (11,3%)	2 (8,3%)
In parte	25 (8,2%)	0	24 (18,3%)	1 (4,2%)
Non lo so	58 (19,1%)	41 (27,5%)	12 (9,3%)	5 (20,8%)
Risposta non compilata	138 (45,4%)	87 (58,4%)	40 (30,5%)	11 (45,8%)

Tabella 6*Fase post analitica: referto*

Risposte	Numero (%) (304 questionari)	Pneumologi (149/304)	Laboratori (131/304)	Qualifica professionale non dichiarata (24/304)
Quesito: Il referto include				
Il tipo di liquido esaminato				
Si	246 (80,9%)	120 (70,8%)	109 (80,5%)	17 (70,8%)
No	17 (5,6%)	15 (10,1%)	1 (0,8%)	1 (4,2%)
Non lo so	0 (0%)	0	0	0
Risposta non compilata	41 (13,5%)	14 (9,4%)	21 (16,0%)	6 (25,0%)
I risultati della valutazione macroscopica				
Si	200 (65,8%)	101 (67,8%)	84 (64,1%)	15 (62,5%)
No	57 (18,8%)	31 (20,8%)	23 (17,6%)	3 (12,5%)
Non lo so	2 (0,7%)	2 (1,3%)	0	0
Risposta non compilata	45 (14,8%)	15 (10,1%)	24 (18,3%)	6 (25,0%)
Il conteggio cellulare totale				
Si	177 (58,2%)	101 (67,8%)	61 (45,0%)	15 (62,5%)
No	48 (15,8%)	22 (14,8%)	23 (18,9%)	3 (12,5%)
Altro	9 (3,0%)	4 (2,7%)	5 (4,1%)	0
Risposta non compilata	70 (23,0%)	22 (14,8%)	42 (32,0%)	6 (25,0%)
Il conteggio dei leucociti				
Si	212 (69,7%)	107 (71,8%)	90 (68,7%)	15 (62,5%)
No	19 (6,3%)	11 (7,4%)	6 (4,9%)	2 (8,3%)
Altro	9 (3,0%)	6 (4,0%)	3 (2,5%)	0
Risposta non compilata	64 (21,1%)	25 (16,8%)	32 (24,4%)	7 (29,2%)
Il conteggio dei neutrofilii				
Si	191 (62,9%)	96 (64,4%)	81 (61,8%)	14 (58,3%)
No	28 (9,2%)	18 (12,1%)	8 (6,6%)	2 (8,3%)
Altro	12 (3,9%)	7 (4,7%)	5 (4,1%)	0
Risposta non compilata	73 (24,0%)	28 (18,8%)	37 (28,2%)	8 (33,3%)
Il conteggio dei linfociti				
Si	186 (61,2%)	96 (64,4%)	75 (57,3%)	14 (58,3%)
No	31 (10,2%)	18 (12,1%)	11 (9,0%)	2 (8,3%)
Altro	13 (4,3%)	7 (4,7%)	6 (4,9%)	0
Risposta non compilata	74 (24,3%)	28 (18,8%)	38 (29,0%)	8 (33,3%)
Il conteggio degli eosinofili				
Si	158 (51,9%)	89 (59,7%)	59 (45,0%)	10 (41,7%)
No	48 (15,8%)	22 (14,8%)	21 (16,0%)	5 (20,8%)
altro	13 (4,3%)	7 (4,7%)	6 (4,6%)	0
Risposta non compilata	85 (28,0%)	31 (20,8%)	45 (34,4%)	9 (37,5%)
Il conteggio di altre cellule non leucocitarie				
Si	101 (33,3%)	55 (36,9%)	39 (29,8%)	0
No	74 (24,3%)	35 (23,5%)	30 (15,3%)	9 (37,5%)
Altro	24 (7,9%)	11 (7,4%)	12 (9,8%)	1 (4,2%)
Risposta non compilata	105 (34,5%)	48 (32,2%)	50 (38,2%)	7 (29,2%)

Tabella 6*Fase post analitica: referto*

Risposte	Numero (%) (304 questionari)	Pneumologi (149/304)	Laboratoristi (131/304)	Qualifica professionale non dichiarata (24/304)
Quesito: Nel referto sono previsti commenti agli esiti?				
Si	94 (30,9%)	42 (28,2%)	45 (34,4%)	7 (29,2%)
No	152 (50,0%)	83 (55,7%)	58 (44,3%)	11 (45,8%)
Non lo so	12 (3,9%)	8 (5,4%)	4 (3,0%)	0
Risposta non compilata	46 (15,1%)	16 (10,8%)	24 (19,6%)	6 (25,0%)
Quesito: Nel referto sono riportati i valori di riferimento?				
Si	166 (54,6%)	89 (59,7%)	67 (51,1%)	10 (41,7%)
No	88 (28,9%)	42 (28,8%)	40 (30,5%)	6 (25,0%)
Non lo so	7 (2,3%)	4 (2,7%)	1 (0,8%)	2 (8,3%)
Risposta non compilata	43 (14,1%)	14 (9,4%)	23 (17,6%)	6 (25,0%)
Quesito: Nel referto sono riportate soglie decisionali?				
Si	60 (19,7%)	34 (22,8%)	21 (16,0%)	5 (20,8%)
No	176 (57,9%)	89 (59,7%)	76 (58,0%)	11 (45,8%)
Non lo so	15 (4,9%)	10 (6,7%)	3 (2,3%)	2 (8,3%)
Risposta non compilata	53 (17,4%)	16 (10,7%)	31 (23,7%)	6 (25,0%)
Quesito: Come sono stati determinati/scelti i valori di riferimento?				
Sono utilizzati quelli per il sangue periferico	19 (6,3%)	11 (7,4%)	5 (3,8%)	3 (12,5%)
Ripresi da letteratura specifica per il LP	119 (39,1%)	56 (37,6%)	59 (45,0%)	4 (16,7%)
Stabiliti dal laboratorio	30 (9,9%)	25 (16,8%)	3 (2,3%)	2 (8,3%)
Non lo so	70 (23,0%)	39 (26,2%)	24 (18,3%)	7 (29,2%)
Risposta non compilata	66 (21,7%)	18 (12,1%)	40 (30,5%)	8 (33,3%)
Quesito: Come sono stati determinate/scelte le soglie decisionali?				
Sono utilizzate quelle per il sangue periferico	7 (2,3%)	3 (2,0%)	2 (1,5%)	2 (8,3%)
Ripresi da letteratura specifica per il LP	80 (26,3%)	52 (34,9%)	23 (17,6%)	5 (20,8%)
Stabiliti dal laboratorio	17 (5,6%)	12 (8,1%)	2 (1,5%)	3 (12,5%)
Non lo so	99 (32,6%)	53 (35,6%)	40 (30,5%)	6 (25,0%)
Risposta non compilata	101 (33,2%)	29 (19,5%)	64 (48,9%)	8 (33,3%)
Quesito: A fronte di quanto viene fatto nella Tua azienda, cosa riterresti opportuno o necessario implementare nell'analisi del LP?				
Niente di più	134 (44,1%)	69 (46,%)	58 (44,3%)	7 (29,2%)
Le seguenti analisi o procedure	88 (28,9%)	47 (31,5%)	33 (25,2%)	8 (33,3%)
Risposta non compilata	82 (27,0%)	33 (22,1%)	40 (30,5%)	9 (37,5%)

evidenza che il pH è eseguito con il pHmetro solo nel 9,2% dei casi. Il metodo per il conteggio e la differenziazione cellulare più frequentemente usato è il conteggio in automazione (22,4%). In questo caso, la strumentazione più frequentemente utilizzata è l'emocitometro con canale di analisi dedicato (14,8%). Solo il 5,6% dei partecipanti risponde di eseguire

l'esame citometrico con un metodo manuale.

Infine, solo il 23,0% e il 21,1% dei partecipanti dichiara che gli analizzatori e i metodi utilizzati, rispettivamente per l'esame citometrico automatizzato e per gli esami biochimici e/o immunometrici, sono specificamente verificati e/o validati per la matrice LP.

Fase post-analitica

I risultati relativi alla fase post-analitica sono riportati in Tabella 6. Il referto riporta il tipo di materiale esaminato nell'80,9% dei casi, e nel 65,8% dei casi è riportata la descrizione macroscopica del campione.

La cellularità totale è indicata nel 58,2% dei casi, mentre il conteggio dei leucociti nel 69,7% dei casi. La differenziazione cellulare con conteggio dei neutrofilii e linfociti è riportata rispettivamente nel 62,9% e nel 61,2% dei casi, mentre il conteggio degli eosinofili solo nel 51,9% dei casi. La quantità di cellule non leucocitarie (cellule mesoteliali o macrofagi) è indicata nel 33,3% dei casi; infine sono inseriti commenti qualitativi prevalentemente di tipo descrittivo nel 30,9% dei casi.

Nel referto sono riportati prevalentemente gli intervalli di riferimento (54,6% dei casi) ripresi dalla letteratura specifica sul LP (39,1%); è interessante notare che per quest'ultimo quesito, ~40% dei partecipanti non fornisce una risposta (21,7% non risponde e 23,0% dichiara di non conoscere la risposta).

Quesito conclusivo

Al quesito "A fronte di quanto viene fatto nella tua Azienda cosa riterresti opportuno o necessario implementare nell'analisi del LP?" la maggior parte dei partecipanti (44,1%) ha risposto che non ritiene opportuno o necessario modificare o integrare il processo di analisi del LP in vigore. Tuttavia, 88 partecipanti (28,9%) hanno fornito alcuni suggerimenti per il miglioramento dell'attività, comprendenti: la stesura di protocolli condivisi fra clinici e laboratoristi (30,7%), l'integrazione nel referto del calcolo dei rapporti di concentrazione (18,2%), l'esecuzione dell'esame citometrico completo corredato da differenziazione cellulare (13,6%), l'allargamento del pannello dei biomarcatori oncologici (11,4%), l'esecuzione della adenosina deaminasi (ADA; 7,9%), una maggiore standardizzazione del referto (4,5%), l'esecuzione del pH (3,4%). È stata registrata infine una miscelanea di risposte (6,8%).

DISCUSSIONE

Il presente questionario rappresenta, per le informazioni attualmente a disposizione del gruppo di lavoro, l'unica fonte di rilevazione della pratica relativa alla gestione del LP. La determinazione nel profondo uno sforzo congiunto, che coinvolga cioè la medicina di laboratorio e i colleghi clinici, fa parte di un percorso avviato da anni all'interno di SIBioC, teso alla definizione di percorsi condivisi con le società cliniche, armonizzati e basati sulle evidenze disponibili. L'ambito delle matrici inconsuete, e dei liquidi cavitari in particolare, ha rappresentato per anni un settore circoscritto nei laboratori di analisi, che ben si presta ad esemplificare i percorsi metodologici che gli attuali concetti di qualità globale impongono di seguire (14). Dal momento della richiesta, fino alla produzione del referto, il rigore metodologico deve guidare il lavoro di

equipe.

Il questionario, con i limiti intrinseci della bassa numerosità del campione, ha il vantaggio di rappresentare equamente le figure professionali coinvolte nel percorso per l'analisi di LP, facilitando l'avvio di un approccio sistematico e non settoriale, atto ad evidenziare i problemi delle singole fasi del processo diagnostico.

In questa prospettiva, alcuni dati e considerazioni, spesso legati a criticità, appaiono di particolare interesse e possono essere riassunti nel seguente modo:

Quesito clinico. La discordanza relativa alla percezione della disponibilità di questo dato tra laboratoristi e pneumologi è significativa. Questo dato sembra derivare dalla mancanza di una modalità di comunicazione strutturata. I clinici hanno chiaro il problema, ma le informazioni non raggiungono in modo adeguato il laboratorio, compromettendo così la qualità della collaborazione nell'arco del percorso diagnostico.

Gestione della fase preanalitica. Sono evidenti criticità relative ai contenitori da utilizzare per la raccolta e invio al laboratorio dei campioni di LP. L'osservazione di una percentuale inferiore al 40% di uso di contenitori appropriati rappresenta infatti motivo di allarme, in quanto in grado potenzialmente di generare bias nei risultati. Il dato appare inoltre di difficile interpretazione, se integrato con l'affermazione di avvenuta condivisione delle procedure tra laboratorio e clinica, così come dichiarato dal 47% dei partecipanti allo studio. Questo scenario pone enfasi sulle reali conoscenze delle linee guida ad oggi disponibili (1-3).

Appropriatezza per pannello analiti da includere nel pannello standard. I dati raccolti rilevano che più del 50% di partecipanti indica: esame macroscopico, pH, glucosio, proteine totali e LDH. Meno del 50% dei partecipanti indica l'esame citometrico o citometrico con differenziazione cellulare. Il pannello ristretto indicato è parzialmente appropriato ma incompleto almeno per i quesiti clinici di base (diagnosi differenziale tra essudato e trasudato, ad esempio), poiché non si avvale di determinazioni a maggiore contenuto informativo, come l'implementazione dei rapporti di concentrazione di proteine totali, LDH e l'esame citometrico. Importante osservare come i clinici mostrino un sostanziale maggiore interesse per questi parametri, rispetto ai colleghi laboratoristi. Tra i suggerimenti per il miglioramento della gestione del processo, molti partecipanti hanno infatti suggerito di integrare l'analisi del LP con questi esami. In particolare, per l'esame citometrico appare maggiormente evidente un limite oggettivo del laboratorio nell'eseguire l'esame, piuttosto che un'assenza di interesse da parte del clinico.

Appropriatezza pannello analiti di approfondimento per situazioni cliniche specifiche. Il questionario ha palesato un sostanziale accordo sulla necessità di riservare la determinazione di creatinina, colesterolo, trigliceridi e lipasi a casi clinici selezionati dagli pneumologi. Per i biomarcatori di neoplasia, meno del 29,6% delle risposte indica che debbano essere richiesti

solo in casi selezionati, mentre una percentuale analoga (31,9%) indica che questo tipo di analisi non dovrebbe essere mai eseguita. Per contro, tra i suggerimenti di miglioramento del processo, una delle indicazioni più frequenti è l'ampliamento del pannello dei biomarcatori (11,4%). Questo aspetto, a fronte delle indicazioni fornite dalla letteratura, che mostrano scarse evidenze a sostegno dell'utilità di queste determinazioni in liquidi non tradizionali (3, 9), suggerisce la necessità di effettuare una revisione e una condivisione delle evidenze della letteratura attualmente a disposizione, finalizzata a una maggiore appropriatezza della richiesta, ma anche alla necessità di pianificare studi robusti e multicentrici atti a produrre le evidenze per una corretta e appropriata valutazione.

Gestione della fase analitica. Il questionario ha chiaramente evidenziato alcune criticità analitiche, quali l'analisi del pH, parametro necessario per il 58,6% dei partecipanti, ma determinato con il pHmetro solo nel 9,2% dei casi. Ulteriore dato critico emerso dall'indagine è che solo il 21,9% dei partecipanti dichiara di utilizzare metodi validati (o verificati) specificamente per matrice LP. L'utilizzo di metodi non idonei all'analisi del LP è un aspetto cruciale, poiché può portare alla refertazione di risultati poco attendibili, condizione non accettabile in un percorso diagnostico volto alla massima qualità. Il conteggio e lo studio della differenziazione cellulare sono eseguiti con protocolli diversi, non armonizzati. E' verosimile che, analogamente a quanto si rende necessario per altre matrici (10, 14-19), i laboratori debbano procedere alla verifica sperimentale delle analisi automatizzate eseguite su canali dedicati. Lo scarso utilizzo della microscopia ottica, ad oggi "gold standard", potrebbe inoltre avere ripercussioni negative sulla qualità del risultato.

Gestione della fase post-analitica. Il referto, in generale, appare carente e poco armonizzato. Non sono definiti univocamente i contenuti minimi e sono soprattutto scarse o eterogenee le indicazioni a supporto del clinico per l'interpretazione del dato, aspetto particolarmente critico quando le informazioni dovessero essere utilizzate da clinici meno esperti. Il referto appare particolarmente carente in termini di completezza dei dati (conta differenziale dei leucociti, conta di cellule mesoteliali o macrofagi) e della inclusione di eventuali commenti interpretativi, la cui presenza potrebbe avere un'importante ricaduta non solo nella corretta valutazione dei risultati, ma anche nella diffusione della cultura di qualità.

Implementazione e miglioramento del processo. La domanda finale del questionario aveva lo scopo di consentire ai partecipanti di esprimere le proprie necessità professionali. E' emerso un quadro variegato, che conferma tuttavia la necessità di governo del processo. Il 30,7% dei partecipanti propone infatti la produzione di documenti condivisi fra clinica e laboratorio.

Questo questionario rappresenta un primo passo per rispondere a questa necessità di maggiore armonizzazione/standardizzazione del processo e di

integrazione fra laboratorio e clinica. Pur nei suoi limiti metodologici, esso fa emergere alcune criticità sulle quali i professionisti del gruppo di lavoro congiunto si confronteranno per proporre un documento condiviso, finalizzato a indirizzare la pratica verso percorsi sicuri, armonizzati e di qualità, comprendenti anche iniziative formative congiunte.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and Laboratory Standard Institute. Body fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guidelines. CLSI document H56-A. 2006 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
2. Clinical and Laboratory Standard Institute. Analysis of Body Fluids in Clinical Chemistry; Approved Guideline. CLSI document C49-A 2007 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
3. Block DR, Algeciras-Schimmich A. Body fluid analysis: clinical utility and applicability of published studies to guide interpretation of today's laboratory testing in serous fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2013;50:107-24.
4. Bignardi GE. Flow cytometry for the microscopy of body fluids in patients with suspected infection. *Clin Pathol* 2015;68:870-8.
5. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, et al. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1689-706.
6. Kopicinovic LM, Culej J. Pleural, peritoneal and pericardial effusions a biochemical approach. *Biochimica Medica* 2014;24:123-37.
7. Burgess LJ. Biochemical analysis of pleural, peritoneal and pericardial effusions. *Clin Chim Acta* 2004;343:61-84.
8. Noppen M, De Waele M, Li R, et al. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1023-6.
9. Knight JA, Kjeldsberg CR. Cerebrospinal, Synovial, and Serous Body Fluids. In: McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21st Ed. Elsevier Saunders, 2006: 437-41.
10. Seghezzi M, Buoro S, Manenti B, et al. Optimization of cellular analysis of synovial fluids by optical microscopy and automated count using the Sysmex XN Body Fluid Mode. *Clin Chim Acta* 2016;462:41-8.
11. Mc Grath EE, Anderson PN. Diagnosis of pleural effusion: a systematic approach. *Am J Crit Care* 2011;20:119-28.
12. Romero-Candeira S, Hernandez L, Romero-Brufao, et al. Is it meaningful to use biochemical parameters to discriminate between transudative and exudative pleural effusions? *Chest* 2002;122:1524-9.
13. Seguera RM. Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusions in children. *Ped Respir Rev* 2004;5:205-12.
14. Lippi G, Plebani M. Opportunities and drawbacks of nonstandard body fluid analysis. *Clin Chem Lab Med* 2017;27:907-9.
15. Bournier G, De la Salle B, George T, et al. International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). ICSH guidelines for the verification and performance of

- automated cell counters for body fluids. *Int J Lab Hematol* 2014;6:598-612.
16. Sandhaus LM. Body fluid cell counts by automated methods. *Clin Lab Med* 2015;35:93-103.
 17. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, et al. Cell population data and reflex testing rules of cell analysis in pleural and ascitic fluids using body fluid mode on Sysmex XN-9000. *Clin Chim Acta* 2016;452:92-8.
 18. Buoro S, Mecca T, Azzarà G, et al. Mindray BC-6800 Body Fluid Mode, performance of nucleated cells and differential count in ascitic and pleural fluid. *Int J Lab Hematol* 2016;38:90-101.
 19. Buoro S, Apassiti Esposito S, et al. Reflex testing rules for cell count and differentiation of nucleated elements in pleural and ascitic fluids on Sysmex XE-5000. *J Lab Autom* 2016;21:297-304.

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

Ada Aita¹, Raffaella Marin¹, Catia Pozzato², Elisa Piva², Laura Sciacovelli², Mario Plebani^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina-DIMED e ²Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi di Padova, Padova

ABSTRACT

Check-list in laboratory medicine: an important tool to improve patient safety. The blood collection. This work aims to describe the results concerning the implementation of a check-list (CL) on blood collection procedures as a tool to prevent errors in laboratory medicine. Literature and operating procedures carried out in three outpatients phlebotomy sites (SMa, SMb, PN) were analysed to identify check-points (CPs). CL draft was evaluated by a multidisciplinary team and tested for one month (September 2014) by 25 physicians and 15 nurses. The filled in CLs were analysed together with the involved staff and a final version was released. CL effectiveness was evaluated immediately after experimentation and one year later. 5661 CL were filled in, out of 9469 venipunctures (59.8%). The percentages of CPs filled in within SMa, SMb and PN were respectively: 100% patient identification and label-sample-identification matching; 80.2, 73.1 and 51.9% vein selection; 96.7, 95.8 and 97.9% needle selection; 82.5, 85.8 and 89.9% tourniquet application time; 98.9, 97.9 and 98.7% tubes filling; 98.4, 97.4 and 98.7% tubes mixing; 27.6, 23.5 and 15% temperature transport; 16.4, 20.8 and 1.3% time transport. The percentages of unsuitable samples in SM and PN were respectively: 0.040 and 0.013% (September 2014); 0.041 and 0.012% (October 2014); 0.024 and 0.16% (September-October 2015). The insufficient number of available CLs, difficulties over communication concerning purpose and methodology, and patients crowding affected the results in SM; anyway the CL was very helpful for trainees. An effective CL should: include only critical CPs, be shared with the staff, take into account organizational peculiarities. CL is a powerful tool to ensure patient safety only when it becomes an integral part of quality management system.

INTRODUZIONE

La medicina di laboratorio, a differenza di altre specialità mediche, chirurgiche o intensive, è spesso considerata una specialità a basso rischio per il paziente (1). Tuttavia è dimostrato che errori nel processo di laboratorio possono tradursi in esiti clinici negativi, oltre che creare la necessità di nuove indagini diagnostiche, visite e terapie inappropriate, costi psicologici ed economici a carico del paziente. Si stima che il rischio che un paziente sia sottoposto a un percorso di cura inappropriato (es. trasfusioni inappropriate e modificazioni della terapia), a seguito di errori nel processo di laboratorio, sia compreso tra il 6,4 e il 12%, e che il ~26-30% degli errori di laboratorio costringa il paziente a ripetere esami di laboratorio e a sottoporsi a consulti medici e ulteriori indagini, talvolta più invasive (ad esempio biopsie, risonanza magnetica, ecc.) (2- 4).

Negli ultimi decenni, la chiara definizione delle fasi e

delle responsabilità nel processo di medicina di laboratorio (5, 6), lo sviluppo tecnologico che ha condotto all'automazione di procedure un tempo eseguite manualmente (7), la forte spinta verso l'armonizzazione (8, 9) e l'introduzione di strumenti per garantire la qualità del processo e la sicurezza del paziente (10-15), hanno certamente contribuito alla riduzione dell'errore (16, 17). Lo scoglio maggiore resta dunque la riduzione dell'errore generato da fattori umani quali, stress, stanchezza, dimenticanze e scarsa conoscenza o osservanza delle procedure.

Tra le procedure di laboratorio non automatizzate e di forte impatto sul processo di cura del paziente (errori o ritardi nella diagnosi e nel trattamento) e sull'organizzazione (ricadute economiche e di immagine), va certamente annoverato il prelievo venoso (18). Al fine di garantire la corretta esecuzione della procedura, la sua armonizzazione in siti di prelievo differenti e la minimizzazione degli errori, sono state

Corrispondenza a: Ada Aita, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova, via Giustiniani 2, 35128, Padova. Tel. 0498211753, fax 0498211981, e-mail ada.aita@aopd.veneto.it

Ricevuto: 09.01.2018

Revisionato: 21.03.2018

Accettato: 22.03.2018

Pubblicato on-line: 19.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.027

prodotte linee guida e raccomandazioni internazionali (19-20) e nazionali (21). Tuttavia, i dati della letteratura dimostrano che queste linee guida non sono sempre recepite (22) e gli errori riguardanti l'idoneità del campione rappresentano attualmente la tipologia di errore più frequente nella fase pre-analitica (23-25). La diffusione delle linee guida e la continua formazione del personale rappresentano le strategie più comunemente utilizzate per la riduzione e prevenzione degli errori in questa fase del processo. Recentemente l'introduzione di una check-list (o lista di controllo), intesa come un elenco di punti e le conseguenti azioni da considerare per l'esecuzione di processi complessi (26), è stata proposta dal gruppo di studio "Variabilità extra-analitica" di SIBioC come strumento da impiegare nelle procedure più a rischio individuate per la raccolta del campione biologico al fine di prevenire l'errore procedurale (27). Sebbene l'efficacia dell'uso di tale strumento sia provata per alcune procedure sanitarie (chirurgiche o per l'inserzione di cateteri venosi centrali) (28, 29), non sono riportate esperienze riguardanti l'applicazione sistematica della check-list per il prelievo venoso, né di altre check-list applicate ad altre fasi del processo di medicina di laboratorio, come strumento di supporto alle procedure di prevenzione e riduzione dell'errore, e quindi di assicurazione di qualità e sicurezza delle cure. Inoltre, sebbene sia nota e documentata l'importanza dell'uso della check-list in medicina, altrettanto noti sono i commenti critici riguardo alle modalità di stesura e applicazione della stessa. In particolare, la mancanza di coerenza metodologica e valutativa, e i possibili bias procedurali spesso mettono in discussione l'attendibilità dei dati pubblicati (30).

Scopo di questo lavoro è descrivere i risultati di un progetto volto a individuare un modello per l'implementazione di una check-list applicabile alla procedura del prelievo ematico come strumento

di prevenzione e riduzione degli errori in medicina di laboratorio.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Lo studio è stato condotto presso l'Unità Operativa Complessa Medicina di Laboratorio (UOC-ML) dell'Azienda Ospedaliera-Università degli Studi di Padova, e si è articolato in tre fasi operative: studio delle linee guida esistenti e del processo da sottoporre a controllo, stesura della check-list e sperimentazione.

Studio delle linee guida

Lo studio delle linee guida (26, 31, 32) ha consentito di individuare i punti chiave utili a garantire la stesura di una check-list efficace:

- definizione di scopo e contesto organizzativo di applicazione della check-list;
- utilizzo di una metodologia puntuale ed efficace;
- coinvolgimento del personale utilizzatore mediante la pianificazione e l'attuazione di momenti informativi e formativi riguardo allo scopo e all'importanza dell'introduzione di una check-list nel processo;
- chiara definizione delle responsabilità;
- coinvolgimento di esperti con competenze differenti.

Scopo e contesto di applicazione. La check-list applicata alla procedura di prelievo venoso doveva avere lo scopo di ridurre gli errori procedurali al fine ultimo di garantire la sicurezza del paziente. Le sedi ambulatoriali locate in via San Massimo (SM) e presso la struttura ospitante il reparto di pneumologia (PN) sotto il diretto controllo dell'UOC-ML, sono state scelte quale contesto di applicazione della check-list. Le caratteristiche organizzative delle due sedi sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1

Caratteristiche delle sedi ambulatoriali contesto di applicazione della check-list

Sedi ambulatoriali	Stanze	Metodologia di etichettatura del campione	Tipologia di paziente
SMa	SM1	Etichettatura automatizzata per mezzo di una stazione pre-analitica per i campioni dei pazienti che accedono alle stanze SM2, SM3 e SM4	Adulti
	SM2, SM3, SM4	Etichettatura automatizzata per mezzo di una stazione pre-analitica presente nella stanza SM1	Adulti
SMb	SM5	Etichettatura automatizzata per mezzo di uno strumento presente nella stanza in cui è eseguito il prelievo	Bambini
	SM6	Etichettatura automatizzata per mezzo di uno strumento presente nella stanza in cui è eseguito il prelievo	Anziani e donne in gravidanza
	SM7	Etichettatura automatizzata per mezzo di uno strumento presente nella stanza in cui è eseguito il prelievo	Adulti con prenotazione
PN	PN1	Etichettatura automatizzata per mezzo di una stazione pre-analitica	Pazienti: in terapia con anticoagulante; sottoposto a controllo per l'avvio di procedure di procreazione assistita o a controllo periodico post-ricovero

SM, struttura San Massimo; PN, reparto di pneumologia.

Studio del processo da sottoporre a controllo

Le istruzioni operative relative alla procedura del prelievo ematico a disposizione del personale dell'UOC-ML e i documenti di riferimento emessi da organismi nazionali (21) e internazionali (19, 20) sono stati analizzati al fine di individuare le attività maggiormente critiche, soggette a errori e di maggiore impatto sull'idoneità del campione. Mediante osservazione diretta

delle fasi del processo (dall'accettazione e identificazione del paziente, all'invio del campione al laboratorio) presso le sedi ambulatoriali SM e PN, è stata successivamente verificata la coerenza delle prassi operative adottate con le istruzioni operative in essere. Il personale deputato al prelievo ematico è stato inoltre intervistato al fine di individuare le criticità legate alla tipologia di paziente e al contesto organizzativo e le attività a maggior rischio d'errore.

Tabella 2

Punti identificati per garantire il controllo completo di tutte le fasi della procedura di prelievo venoso

Punti di controllo

Ritiro prescrizione medica e valutazione della possibilità di soddisfare la richiesta (es. tipologia di esami richiesti)
Verifica della completezza delle informazioni e di soddisfazione di requisiti specifici (es. documento di identificazione certa in caso di esami con valenza medico legale)
Applicazione della corretta procedura di identificazione del paziente e verifica dei documenti
Raccolta del consenso informato, ove necessario
Inserimento nel sistema informatico dei dati: anagrafica del paziente, esami richiesti e commenti particolari
Verifica della completezza e correttezza dei dati inseriti
Stampa della documentazione: foglio accettazione ed etichette
Indicazioni per le modalità e i tempi di ritiro del referto
Consegna della documentazione: foglio accettazione ed etichette e impegnativa
Raccolta di altri campioni (urine, feci, ecc), ove richiesti
Etichettatura manuale dei campioni, ove applicabile
Verifica dell'identificazione del paziente al momento del prelievo
Verifica delle condizioni fisiopatologiche del paziente per accertarne l'idoneità alla procedura (digiuno, stress, esercizio fisico, assunzione di farmaci)
Valutazione del patrimonio venoso
Verifica della correttezza e congruenza degli esami richiesti
Verifica della corrispondenza delle informazioni di identificazione del paziente (identità del paziente-foglio di accettazione-etichette)
Identificazione dell'ordine di raccolta delle provette
Scelta del sito di raccolta (braccio, mano, piede)
Scelta dei dispositivi (dimensioni dell'ago, tipologia di siringa)
Scelta del sito di posizionamento e del tempo di applicazione del laccio
Corretta disinfezione e, ove necessario (ad es. bambini), uso di anestetici locali
Rispetto dei tempi di raccolta, ove necessario
Corretta esecuzione della procedura di prelievo
Verifica del tempo di applicazione del laccio
Rimozione del laccio entro i tempi definiti e prima di sfilare l'ago
Utilizzo della provetta corretta sulla base dell'ordine di raccolta delle provette
Verifica del volume di riempimento delle provette
Capovolgimento delle provette dopo il riempimento
Pressione sul sito di prelievo
Verifica delle condizioni del paziente
Corretta conservazione (tempo e temperatura) del campione subito dopo la raccolta
Invio dei campioni in laboratorio
Corretta conservazione (tempo e temperatura) del campione durante il trasporto al laboratorio
Smaltimento del materiale utilizzato per il prelievo

Preparazione della check-list

Definizione dei punti di controllo. I punti da sottoporre a controllo sono stati individuati sulla base dell'analisi delle linee guida (17, 20, 26, 31, 32) e delle istruzioni operative in essere, e da quanto emerso dall'osservazione diretta e dalle interviste al personale deputato al prelievo.

Sono stati individuati 34 punti di controllo per la verifica dell'attuazione della corretta procedura (Tabella 2), al fine di garantire il controllo completo di tutte le fasi della procedura di prelievo venoso, dall'accettazione del paziente all'invio del prelievo al laboratorio per l'analisi. Al fine di individuare le aree e le responsabilità del controllo (segreteria, ambulatorio, trasporto), i punti di controllo sono stati successivamente organizzati in 9 categorie: accettazione, accertamento identità del paziente, valutazione del paziente, scelta dei dispositivi e del laccio, prelievo, verifica delle condizioni del paziente, conservazione dei campioni, smaltimento dei materiali prelievo, invio dei campioni.

Stesura della check-list. La lista di punti di controllo è stata analizzata da un gruppo costituito da esperti con competenze e responsabilità differenti: responsabile della qualità, medici responsabili della gestione dei due ambulatori sede della sperimentazione, coordinatore infermieristico e infermiera referente. Al fine di garantire un semplice ed efficace utilizzo della check-list e non ultimo il rispetto dei tempi d'attesa, il gruppo di esperti ha ritenuto opportuno:

- ridurre il numero dei punti di controllo da 34 a 9 e quello delle categorie da 9 a 4. Per individuare quali punti eliminare, è stata verificata, mediante osservazione diretta, l'operatività del personale nelle specifiche attività, identificando le fasi in cui il personale dimostrava attinenza alle procedure in essere, sicurezza nell'operatività e congruenza di operatività tra i diversi operatori. In particolare sono stati eliminati i punti relativi all'accettazione del paziente, alla scelta del sito di prelievo e alla disinfezione (33). Sono stati privilegiati invece i punti di controllo a maggior impatto sulla sicurezza del paziente e all'idoneità del campione. In particolare: la verifica dell'identità del paziente e la congruità richiesta-paziente-etichetta (in quanto la fase di identificazione del paziente risulta tra le più vulnerabili del processo) (34), la scelta del dispositivo, il tempo di posizionamento del laccio emostatico, il volume di riempimento delle provette, il mescolamento delle provette e le condizioni di conservazione (tempo e temperatura) del campione (35);

- migliorare la descrizione di altri punti di controllo (tipologia di paziente: bambino/adulto/anziano; scelta dell'ago: retto o farfalla; numero di provette; conservazione del campione: ghiaccio, 37 °C);

- inserire simboli ed elementi colorati che catturassero l'attenzione dell'operatore sul rispetto delle procedure nelle fasi più critiche del processo. Tuttavia, una successiva analisi dei costi ha evidenziato l'impossibilità di disporre di un gran numero di copie a colori a costi contenuti. Il modello preliminare (Figura 1a) è stato

dunque sostituito da una versione in bianco e nero (Figura 1b) a scapito di un immediato impatto visivo.

Sperimentazione della check-list

La bozza definitiva (Figura 1b) è stata presentata al personale deputato alla procedura di prelievo venoso (25 medici, di cui 14 specializzandi e 15 infermieri) nelle sedi individuate per la sperimentazione. Scopo d'uso e campo di applicazione della check-list, responsabilità, modalità di compilazione e tempi di sperimentazione sono state illustrate durante una riunione con tutto il personale coinvolto. La check-list è stata dunque testata presso gli ambulatori SM e PN dal 27 agosto 2014 per quattro settimane, al termine delle quali è stata organizzata una riunione di chiusura della sperimentazione durante la quale le check-list compilate sono state analizzate. Fattibilità, criticità e punti di forza sono stati discussi assieme al personale coinvolto, prima di rilasciare la revisione finale.

Valutazione dell'efficacia

L'efficacia della check-list, intesa come strumento di riduzione e prevenzione degli errori, è stata valutata sia a breve che a lungo termine. L'efficacia dell'utilizzo della check-list in fase sperimentale è stata valutata confrontando la percentuale di campioni non idonei registrata nelle sedi ambulatoriali durante la sperimentazione (27 agosto - 24 settembre 2014) e un mese dopo (25 settembre - 31 ottobre 2014) con quella registrata nello stesso periodo negli anni precedenti (2012-2013).

E' stata poi programmata un'ulteriore valutazione dell'efficacia a un anno dall'introduzione in routine della check-list.

Analisi dei dati

Le check-list quotidianamente compilate sono state analizzate per sede ambulatoriale, operatore e singolo punto di controllo al fine di individuare differenze nell'approccio alla compilazione e di verificarne la completezza. E' stata quindi condotta un'analisi statistica descrittiva con l'aiuto del software SigmaStat 3.5 – Systat Software Inc. Point Richmond, Ca USA.

RISULTATI

Nel periodo di sperimentazione (quattro settimane) sono state compilate e analizzate 5661 check-list, su un numero totale di 9469 prelievi eseguiti (59,8%). Nella Tabella 3 sono riportati il numero di check-list compilate e la percentuale calcolata in relazione al numero di prelievi eseguiti in ciascuna sede ambulatoriale. La percentuale di compilazione maggiore è stata registrata presso la sede PN (79,9%). Nella sede SM (52,7% di check-list compilate) la percentuale di compilazione è risultata bassa presso gli ambulatori afferenti a SMB (19,8%).

È stata analizzata la compilazione di ciascun punto di

A



Università degli Studi Padova – Azienda Ospedaliera di Padova
UOC Medicina di Laboratorio
Direttore prof. Mario Plebani



CHECKLIST PROCEDURA PRELIEVO VENOSO
Ambulatorio prelievi

ETICHETTA
ACCETTAZIONE

	SI	NO	Note
ACCERTAMENTO IDENTITÀ DEL PAZIENTE			
Verificata identità del paziente			
Verificata corrispondenza con etichette provette			
DISPOSITIVI E LACCIO			
Valutato patrimonio venoso			
Scelta dispositivo			<input type="checkbox"/> > 6 provette <input type="checkbox"/> Bambino/anziano <input type="checkbox"/> vene piccole dimens/difficili
ago retto <input type="checkbox"/> ago a farfalla <input type="checkbox"/>			
Attenzione a tempo posizionamento laccio (inferiore 2')			No laccio per: vene grosse <input type="checkbox"/> pH venoso <input type="checkbox"/> ac. lattico <input type="checkbox"/> Ca ionizzato <input type="checkbox"/> NSE <input type="checkbox"/>
PRELIEVO			
Controllato che ci sia il corretto volume sangue nelle provette			
Capovolgere campione alcune volte lentamente			3-4x 5-6x 8-10x
INVIO CAMPIONE			
Controllata e mantenuta temperatura consigliata del campione pre-invio a laboratorio			Indicare test: da etichette/libro di bordo. Es: CRIOG.
Inviato campione nei tempi prestabiliti			<input type="checkbox"/> ECP <input type="checkbox"/> TRIPTASI

AMBULATORIO N. _____ SIGLA OPERATORE _____

B



Università degli Studi Padova – Azienda Ospedaliera di Padova
UOC Medicina di Laboratorio
Direttore prof. Mario Plebani



CHECKLIST PROCEDURA PRELIEVO VENOSO
Ambulatorio prelievi

ETICHETTA
ACCETTAZIONE

	SI	NO	Note
ACCERTAMENTO IDENTITÀ DEL PAZIENTE			
Verificata identità del paziente			
Verificata corrispondenza con etichette provette			
DISPOSITIVI E LACCIO			
Valutato patrimonio venoso			
Scelta dispositivo			<input type="checkbox"/> > 6 provette <input type="checkbox"/> Bambino/anziano <input type="checkbox"/> vene piccole dimens/difficili
ago retto <input type="checkbox"/> ago a farfalla <input type="checkbox"/>			
Attenzione a tempo posizionamento laccio (inferiore 2')			No laccio per: vene grosse <input type="checkbox"/> pH venoso <input type="checkbox"/> ac. lattico <input type="checkbox"/> Ca ionizzato <input type="checkbox"/> NSE <input type="checkbox"/>
PRELIEVO			
Controllato che ci sia il corretto volume sangue nelle provette			In particolare: Celeste , Lilla Viola, Verde, Quantiferon
Capovolgere campione alcune volte lentamente			3x Azzurro 5-6x Ocra, Rosso, Blu, Beige, Trasp, Ruggine 8-10x Verde chiaro scuro, viola lilla rosa giallo, grigio, arancio, Quantiferon, Microtainer
INVIO CAMPIONE			
Controllata e mantenuta temperatura consigliata del campione pre-invio a laboratorio			Indicare test: da etichette/libro di bordo. Es: CRIOG.
Inviato campione nei tempi prestabiliti			<input type="checkbox"/> ECP <input type="checkbox"/> TRIPTASI

AMBULATORIO N. _____ SIGLA OPERATORE _____

Figura 1

Prima bozza di check-list: 9 punti di controllo organizzati in 4 categorie. La bozza preliminare arricchita di simboli ed elementi colorati volti a catturare l'attenzione dell'operatore (a), è stata successivamente sostituita da una bozza definitiva in bianco e nero (b).

Tabella 3

Numero e percentuale di check-list compilate nelle sedi ambulatoriali oggetto della sperimentazione

	Sedi ambulatoriali			Totale
	SMa	SMb	PN	
	2395 (33,0%)	1429 (19,8%)		
Check-list compilate, n (%)	3824 (52,7%)		1837 (79,9%)	5661 (59,8%)
Prelievi venosi, n	7254		2215	9469

SM, sede ambulatoriale locata in via San Massimo; PN, sede ambulatoriale locata nel reparto di pneumologia.

controllo della check-list. I dati, inclusi nella Tabella 4 ed espressi in percentuale rispetto al totale di check-list compilate per sede ambulatoriale, sono riportati in termini di mediana, 25° e 75° percentile.

I dati evidenziano una parziale e disomogenea compilazione nelle tre differenti sedi ambulatoriali di 3 dei 9 punti di controllo e precisamente: valutazione del patrimonio venoso, verifica della temperatura e del tempo di conservazione del campione prima dell'invio al laboratorio. Inoltre, relativamente alla scelta del dispositivo di prelievo, sebbene l'ago retto si sia dimostrato il dispositivo d'elezione in accordo a quanto richiesto dalle linee guida (19-21), l'ago a farfalla è stato

utilizzato in una percentuale superiore al 30%, negli ambulatori PN e SMb.

Infine, è stata valutata l'efficacia della check-list, concepita come strumento di prevenzione dell'errore procedurale. La percentuale di campioni non idonei, registrata durante il mese di sperimentazione della check-list e nel periodo immediatamente successivo (25 settembre - 31 ottobre 2014), è stata confrontata con quella registrata nello stesso periodo negli anni precedenti (2012-2013). Nella Tabella 5 sono riportati i dati relativi alla valutazione dell'efficacia a breve termine. La percentuale di campioni non idonei registrata durante la fase di sperimentazione della check-list è risultata

Tabella 4

Percentuale di compilazione dei singoli punti di controllo sul totale di check-list compilate per sede ambulatoriale

	Sedi Ambulatoriali		
	SMa	SMB	PN
Check-list compilate, n (%)	2395 (33)	1429 (19,7)	1837 (79,9)
<i>Punti di controllo compilati, mediana % [25°-75° percentile]</i>			
Verifica dell'identità del paziente	100 [100-100]	100 [100-100]	100 [98,9-100]
Verifica di congruenza: identità del paziente-etichette-richiesta	100 [98,9-100]	100 [98,5-100]	100 [98,7-100]
Valutazione del patrimonio venoso	80,2 [69,5-90,4]	73,1 [57,1-88,9]	51,9 [44,4-71,1]
Scelta del dispositivo	96,7 [94,8-98,8]	95,8 [93,9-97,9]	97,9 [96-100]
Ago retto	66,9 [60,5-71,5]	63,3 [52,7-72,1]	59,2 [54,1-68,6]
Ago a farfalla	30,8 [26,5-36,7]	32,5 [25-45,2]	38,7 [31,4-45,6]
Tempo di posizionamento del laccio (inferiore a 2 minuti)	82,5 [75,1-95,7]	85,8 [71,4-95,9]	89,9 [78,9-94,4]
Verifica del corretto volume di riempimento delle provette	98,8 [95-100]	97,9 [96-100]	98,7 [98,5-100]
Capovolgimento delle provette a seguito del prelievo	98,4 [96,8-99,3]	97,4 [91,4-100]	98,7 [96,2 -100]
Verifica della corretta temperatura di conservazione del campione prima dell'invio in laboratorio	27,6 [13,2-41,9]	23,5 [10-46,1]	5 [2,4-16,7]
Verifica del corretto tempo di conservazione del campione prima dell'invio in laboratorio	16,41 [10,1-30,0]	20,8 [0-46,1]	1,3 [0-12,2]

SM, sede ambulatoriale locata in via San Massimo; PN, sede ambulatoriale locata nel reparto di pneumologia.

Tabella 5

Percentuale di campioni non idonei calcolata sul numero totale di campioni, registrata durante (27 agosto - 24 settembre 2014) e al termine della sperimentazione (25 settembre - 31 ottobre 2014) e confrontata con quella registrata presso le stesse sedi ambulatoriali, nello stesso periodo di tempo, negli anni precedenti (2012-2013)

	2012		2013		2014	
	SM	PN	SM	PN	SM	PN
Campioni, n	25051	8069	23486	8004	20120	7599
Campioni non idonei, n (%)	9 (0,036)	0 (0,000)	9 (0,038)	0 (0,000)	8 (0,040)	1 (0,013)
25 Settembre – 31 Ottobre 2014						
Campioni, n	26141	9581	25852	9307	31961	8667
Campioni non idonei, n (%)	15 (0,057)	0 (0,000)	15 (0,058)	2 (0,021)	13 (0,041)	1 (0,012)

SM, sede ambulatoriale locata in via San Massimo; PN, sede ambulatoriale locata nel reparto di pneumologia.

pressoché invariata rispetto agli anni precedenti. Dall'analisi e discussione dei dati con il personale coinvolto nella sperimentazione sono emersi importanti aspetti di carattere generale e organizzativo riguardo l'utilizzo della check-list applicata alla procedura di prelievo venoso ambulatoriale, di seguito riassunti.

Per gli aspetti generali:

- lo scopo dell'utilizzo di una check-list applicata a una procedura ormai consolidata, quale quella del prelievo venoso ambulatoriale, non è stato compreso da tutto il personale coinvolto;
- la check-list si è rivelata un utile strumento di

supporto alla formazione di tirocinanti, specializzandi e personale neoassunto;

- il personale con maggiore esperienza sul campo ha ritenuto ridondanti i punti di controllo relativi alla verifica dell'identità del paziente e alla valutazione del patrimonio venoso;
- sono stati definiti poco comprensibili i punti di controllo relativi alla verifica della temperatura e del tempo di conservazione del campione prima dell'invio al laboratorio per l'esecuzione dell'analisi.

Per gli aspetti organizzativi:

- il personale coinvolto nella sperimentazione ha

riportato un difetto di comunicazione prima dell'utilizzo della check-list stessa relativamente allo scopo di applicazione e alla metodologia di compilazione della check-list;

- il numero di copie di check-list disponibili nelle fasce orarie e nelle sedi a maggior accesso (SMa e SMb) è stato ritenuto insufficiente.

A fronte delle considerazioni emerse, sono stati chiariti a tutto il personale utilizzatore i dubbi riguardo alle modalità di compilazione e allo scopo e campo di applicazione. Al fine di garantire la pronta disponibilità della check-list, si è deciso di generare la stampa della check-list in associazione al foglio d'accettazione in uscita, evitando così la distribuzione manuale. La check-list nella sua revisione finale (Figura 1b) è stata inserita nel processo quale strumento di assicurazione della qualità e della sicurezza delle cure.

L'efficacia a lungo termine dell'utilizzo della check-list è stata programmata a un anno dalla distribuzione della revisione finale; i dati sono presentati nella Tabella 6.

La percentuale del numero di campioni non idonei registrata nel periodo oggetto di studio (27 Agosto - 31 Ottobre) è stata confrontata con quella registrata nello stesso periodo dell'anno seguente, quando la check-list era ormai parte integrante del sistema di gestione per la qualità della UOC-ML. Nel 2015, la percentuale del numero totale di campioni non idonei è risultata dimezzata rispetto agli anni precedenti. Le cause di non accettabilità del campione risultano essere legate alla qualità (coagulato, emolizzato) e quantità del campione (errato rapporto sangue-anticoagulante, volume insufficiente); non sono stati registrati errori relativi all'identificazione del campione. Complessivamente, a

un anno dall'implementazione della check-list, tutte le tipologie di campione non idoneo avevano subito una riduzione percentuale.

DISCUSSIONE

Nel 2013, il gruppo di studio "Variabilità extra-analitica" di SIBioC, attraverso un documento societario aveva diffuso una lista sintetica delle attività più a rischio d'errore nell'esecuzione del prelievo venoso, con l'auspicio che questa, adattata alle differenti caratteristiche locali, potesse essere utilizzata in tutte le strutture deputate alla raccolta di campioni di sangue venoso (27). Tuttavia, non sono disponibili in letteratura esempi dell'applicazione e dell'efficacia della check-list proposta in contesti diversi per locazione geografica, tipologia di pazienti afferenti, organizzazione dei processi, risorse disponibili, fattori di contenimento dei rischi.

Dall'analisi di studi condotti in diversi contesti ospedalieri (terapie intensive, pronto soccorso, reparti chirurgici), Ko et al (30) hanno evidenziato che differenze nella stesura della check-list (grado di descrizione dei singoli punti di controllo) e nel contesto di applicazione, turn-over del personale durante le fasi di stesura e applicazione, inadeguata comprensione e compilazione, inadeguata definizione dei tempi di valutazione dell'efficacia, possono compromettere l'efficacia della check-list stessa, valutata in termini di outcome sul paziente.

Inoltre, al fine di garantire l'efficacia della check-list come strumento di prevenzione dell'errore pre-analitico e di sicurezza del paziente, le linee guida disponibili

Tabella 6

Percentuale di campioni non idonei presentata per tipologia, registrata nel periodo oggetto di studio (27 agosto- 31 ottobre 2014) e confrontata con il dato registrato presso le stesse sedi ambulatoriali, nello stesso periodo di tempo, l'anno seguente (2015)

	2014		2015	
	SM	PN	SM	PN
27 Agosto- 31 Ottobre				
Campioni, n	52081	16266	48721	24451
Campioni non idonei, n (%)	21 (0,040)	2 (0,012)	12 (0,024)	4 (0,016)
<i>Tipologia di campione non idoneo</i>				
Coagulato, n (%)	10 (0,019)	0 (0,000)	6 (0,012)	1 (0,004)
Emolizzato, n (%)	2 (0,004)	1 (0,006)	1 (0,002)	0 (0,000)
Errato rapporto sangue-anticoagulante, n (%)	6 (0,012)	0 (0,000)	1 (0,002)	2 (0,008)
Volume insufficiente, n (%)	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)
Campione scorretto, n (%)	3 (0,005)	1 (0,006)	4 (0,008)	1 (0,004)

SM, sede ambulatoriale locata in via San Massimo; PN, sede ambulatoriale locata nel reparto di pneumologia.

raccomandano la definizione di una metodologia puntuale di stesura della check-list, il coinvolgimento di tutto il personale e la chiara definizione delle responsabilità (26, 31, 32).

Scopo del progetto era dunque sviluppare una metodologia utile alla stesura e all'implementazione di una check-list che si adattasse al contesto di applicazione e che guidasse il personale nella puntuale esecuzione della procedura del prelievo ematico al fine di prevenire errori che potrebbero inficiare la qualità del campione e che, generalmente, sono il frutto di scarsa osservanza delle procedure in essere, di interruzioni continue dei flussi di lavoro, di carichi di lavoro eccessivi, o di fattori umani quali stress, dimenticanze e scarsa attenzione nelle fasi più critiche del processo. I risultati di questo progetto, articolato in diverse fasi di analisi e discussione dei dati, dimostrano che:

- la pianificazione chiara e puntuale di tutte le fasi del progetto e delle responsabilità garantisce un efficace utilizzo (preparazione e distribuzione) della check-list. La riunione a conclusione della fase di sperimentazione ha messo in luce le problematiche connesse alla fase di pianificazione delle attività e delle responsabilità. La differente modalità di distribuzione della check-list nelle due sedi ambulatoriali, SM e PN, ha determinato una differente adesione al progetto. Nella sede PN la check-list accompagnava sempre il foglio di accettazione, nella sede SM invece, la check-list in certi casi accompagnava la documentazione del paziente, mentre in altri era a disposizione dell'operatore in uno spazio dedicato. L'assenza di copie disponibili nello spazio dedicato e nelle fasce orarie a maggior accesso, le dimenticanze del personale deputato al prelievo e un carico di lavoro maggiore, hanno determinato un'inferiore percentuale di compilazione della check-list nella sede SM;

- l'utilizzo della check-list è strettamente legato ai flussi organizzativi e alle peculiarità dell'organizzazione nella quale si intenda applicarla. Nella sede SM, ove il numero di pazienti afferenti è più elevato, nelle fasce orarie a maggior accesso e nei casi in cui era richiesta la gestione di ulteriore documentazione (notizie cliniche, approfondimenti diagnostici, consensi informati) durante la procedura di prelievo venoso, il personale ha preferito garantire i tempi d'attesa a scapito della compilazione della check-list, ritenuta un ulteriore carico di lavoro. La ridotta percentuale di compilazione della check-list evidenziata negli ambulatori SMb è inoltre strettamente connessa alla tipologia di paziente. Per ammissione stessa del personale utilizzatore, la check-list non è stata compilata nei casi in cui la procedura di prelievo richiedesse maggiore attenzione (prelievo a bambini e anziani);

- verificare il coinvolgimento del personale è indispensabile al fine di garantire una compilazione consapevole. La riunione di chiusura della fase sperimentale ha evidenziato che il personale utilizzatore non aveva compreso lo scopo d'uso della check-list che era stato trasmesso durante la riunione di apertura. In molti casi gli operatori hanno ammesso di compilare la check-list in maniera automatica, senza alcuna

attenzione ai singoli punti di controllo, ma solo perché richiesto. E' dunque necessario assicurarsi del coinvolgimento del personale in più momenti durante la fase di sperimentazione. Si è dimostrato inoltre essenziale il ruolo del team leader. Nella sede PN, ove il carico di lavoro è inferiore e il team leader ha potuto seguire e gestire la sperimentazione con maggior attenzione, fornendo chiarimenti e suggerimenti all'occorrenza, è stata registrata una maggiore adesione al progetto e una maggiore consapevolezza del personale;

- è necessario verificare la corretta interpretazione dei punti di controllo della check list da parte del personale che deve utilizzarla. La scorretta interpretazione dei punti di controllo relativi alla verifica della temperatura e del tempo di conservazione del campione prima dell'invio al laboratorio, ha determinato una bassa percentuale di compilazione. I punti di controllo avevano l'obiettivo di ricordare all'operatore di verificare, tramite l'indicazione riportata sull'etichetta, se il campione necessitasse di una temperatura di conservazione o tempi di consegna definiti. Il controllo doveva dunque essere eseguito per ciascuna provetta. Gli utilizzatori hanno invece riferito di aver compilato i punti di controllo solo nei casi in cui i campioni richiedessero una particolare conservazione o tempi di consegna definiti;

- la stesura di una check-list non può prescindere dalle peculiarità dell'organizzazione nella quale si intenda applicarla. La differente modalità operativa attuata nelle sale prelievo dell'ambulatorio SM relativamente all'etichettatura dei campioni potrebbe richiedere una formulazione differente del punto di controllo relativo all'identificazione del paziente. Negli ambulatori SM5-SM7, ove l'etichettatura delle provette è automatizzata ed è eseguita nella stanza in cui viene effettuato il prelievo, il punto di controllo che ha l'obiettivo di verificare la congruenza tra i dati anagrafici del paziente riportati sul foglio d'accettazione e le provette etichettate, potrebbe non essere incluso. La check-list potrebbe includere punti di controllo differenti in base alla tipologia di pazienti afferenti ai diversi ambulatori. Per esempio, nel caso di ambulatori dedicati al prelievo a neonati (SM5), il check-point relativo alla scelta del dispositivo (ago retto-ago a farfalla) potrebbe essere considerato ridondante;

- sperimentare la check-list è fondamentale per individuare ciò che è necessario migliorare. La fase sperimentale oltre a verificare l'applicabilità, i punti di forza e le criticità della check-list ha consentito di verificare la correttezza dei singoli punti di controllo in relazione allo scopo d'uso. In generale, l'analisi delle check-list compilate durante la fase sperimentale ha dimostrato un'elevata adesione e compilazione dei punti di controllo individuati (compilazione pari al 90-100%). Non sono state, inoltre, registrate importanti differenze di compilazione fra le differenti sedi. Gli utilizzatori hanno riferito di reputare ridondanti i punti di controllo relativi alla valutazione di corretta identificazione del paziente e all'interpretazione del patrimonio venoso. Tuttavia, considerando l'identificazione del paziente una fase

cruciale del processo, gli utilizzatori hanno sempre compilato il punto di controllo relativo. Al contrario, ritenendo ovvia la valutazione del patrimonio venoso per l'esecuzione della procedura stessa, il punto di controllo relativo ha registrato una ridotta percentuale di compilazione. E' risultata inoltre molto buona l'osservanza dei punti di controllo relativi al volume di riempimento corretto del campione e al capovolgimento della provetta (98% di compilazione). Tuttavia durante la riunione di chiusura il personale ha riferito alcune perplessità sulla necessità di capovolgere le provette per il numero di volte indicato nella check-list, nonostante le linee guida e la letteratura riportino l'importanza di rimescolare in modo efficace il campione (17, 20, 27, 28, 30, 36).

Riassumendo, la fase sperimentale ha dimostrato che perché una check-list sia applicabile deve:

- riportare solo i punti di controllo necessari e non includere quelli ridondanti;
- includere i punti di controllo chiaramente esplicativi che non inducano mis-interpretazioni;
- stimolare suggerimenti e critiche da parte degli operatori;
- esserne compresi lo scopo e la modalità di gestione.

I risultati hanno inoltre dimostrato che la valutazione dell'efficacia di uno strumento per la qualità richiede tempi lunghi affinché il personale utilizzatore possa comprenderne lo scopo e la migliore gestione. Sebbene apparissero sconcertanti i risultati analizzati durante e immediatamente dopo la sperimentazione, nella valutazione a lungo termine, la check-list si è dimostrata un efficace strumento di assicurazione della qualità e della sicurezza del paziente determinando, a un anno dalla sua introduzione, quasi il dimezzamento degli errori in fase di prelievo venoso.

La check-list proposta ha, di fatto, un duplice scopo: ricordare all'operatore l'esecuzione di tutte le fasi della procedura e focalizzare l'attenzione sulle attività risultate a maggior rischio d'errore.

Il controllo relativo alla scelta dell'ago (retto o a farfalla), per esempio, richiedeva di indicare anche la motivazione della scelta in relazione alla tipologia di paziente, al fine di guidare l'operatore all'utilizzo dell'ago a farfalla solo nei casi appropriati (bambino o anziano, o in presenza di vene fragili) prevenendo così il numero di campioni non idonei per volume inadeguato o rapporto inadeguato rispetto al volume dell'anticoagulante (35). Il controllo relativo al capovolgimento delle provette, oltre a garantire la miscelazione del campione, doveva aiutare il prelevatore, a effettuare il numero di inversioni richieste per la specifica tipologia di campione, al fine di evitare la formazione di coaguli. Il controllo della temperatura di conservazione invece, doveva garantire l'adeguata conservazione dei campioni che richiedevano particolari condizioni, e allo stesso tempo prevenire l'inadeguata conservazione degli altri, prevenendo per esempio l'emolisi del campione.

La riduzione di campioni insufficienti, raccolti in volume inadeguato rispetto all'anticoagulante, emolizzati o coagulati, un anno dopo l'introduzione della check-list

nel flusso operativo, dimostra che la check-list può essere considerata un potente strumento per prevenire gli errori pre-analitici che hanno impatto sulle fasi successive dell'intero processo d'esame (fase intra- e post-analitica) e quindi sulla sicurezza e outcome del paziente (37). Tuttavia è necessario che la check-list sia parte integrante di un sistema di gestione per la qualità e di un sistema in cui sia ritenuta strategica la consapevolezza del personale relativamente all'importanza del suo utilizzo. Nella nostra esperienza, sono state necessarie attività di sensibilizzazione del personale a porre una sempre maggiore attenzione all'appropriato uso della check-list durante la fase di sperimentazione e a prendere coscienza dell'importanza dell'attività di prelievo nella prevenzione degli errori e la sicurezza del paziente. Queste attività potrebbero dunque essere considerate un punto debole del lavoro ai fini della valutazione dell'efficacia della check-list come strumento di prevenzione dell'errore durante la raccolta del campione biologico.

CONCLUSIONI

Lo sviluppo e la sperimentazione di un modello per l'implementazione di una check-list applicabile alla procedura del prelievo venoso come strumento di prevenzione degli errori in medicina di laboratorio, ha permesso di dimostrare che:

- la check-list può essere un ottimo sistema di controllo sui processi solo se disegnata tenendo conto delle peculiarità del contesto in cui verrà inserita;
- la check-list deve essere plasmabile, adattabile alla realtà in cui dovrà inserirsi senza creare ulteriore sovraccarico di lavoro e rispondendo alle esigenze dell'organizzazione;
- il personale deve essere formato riguardo allo scopo d'uso della check-list e alla sua compilazione prima della sperimentazione, deve inoltre essere continuamente sensibilizzato durante tutta la sperimentazione. La chiara identificazione di un team leader è indispensabile per la sensibilizzazione del personale al fine di garantire un'efficace utilizzo della check-list;
- la check-list è ritenuta inoltre un utile strumento di supporto nell'attività di formazione di tirocinanti, specializzandi, neo assunti e nell'ottica del miglioramento di tracciabilità ed efficienza.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Kalra J. Medical errors: impact on clinical laboratories and other critical areas. *Clin Biochem* 2004;37:1052-62.
2. Ross JW, Boone DJ. Institute on critical issues in health laboratory practice. In: Martin L, Wagner W, Essien JDK, eds. Wilmington, DE: DuPont Press, 1989:173.
3. Nutting PA, Main DS, Fisher PM, et al. Problems in

- laboratory testing in primary care. *J Am Med Assoc* 1996;275:635–9.
4. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 1997;43:1348–51.
 5. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;245:1762-3.
 6. Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to- brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. *Am J Clin Pathol* 2011;136:829-33.
 7. Riben M. Laboratory automation and middleware. *Surg Pathol Clin* 2015;8:175-86.
 8. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: more than clinical chemistry? *Clin Chem Lab Med* 2017. doi:10.1515/cclm-2017-0865.
 9. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: Requests, samples, measurements and reports. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53:184-96.
 10. International Organization for Standardization (ISO). ISO 15189:2012. Medical laboratories – Requirements for quality and competence. Geneva. 2012.
 11. International Organization for Standardization (ISO). ISO 31000:2009. Risk management—Principles and guidelines. Geneva. 2009.
 12. International Organization for Standardization (ISO). ISO/TS 22367:2008. Medical laboratories – Reduction of error through risk management and continual improvement. Geneva. 2008.
 13. Clinical Laboratory Standards Institute. Laboratory Quality Control based on Risk management. CLSI EP23-A document. Approved Guideline, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
 14. Secchiero S, Sciacovelli L, Zardo L, et al. Appropriateness of cholesterol and triglycerides reporting checked by External Quality Assessment programs. *Clin Chim Acta* 2003;333:221-30.
 15. Plebani M, Sanzari MC, Zardo L. Quality control in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:642-6.
 16. Witte DL, VanNess SA, Angstadt DS, et al. Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results: how many? *Clin Chem* 1997;43:1352-6.
 17. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, et al. per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL-CISMEL sulla variabilità extra-analitica del dato di laboratorio. Raccomandazioni per la rilevazione e la gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici. *Biochim Clin* 2007;31:216-24.
 18. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. *Clin Lab* 2006;52:217–30.
 19. Clinical Laboratory Standards Institute. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. CLSI H3- A6 document. Approved guideline, 6th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
 20. World Health Organization. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. WHO Press, Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2015. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/268790/WHO-guidelines-on-drawing-blood-best-practices-in-phlebotomy-Eng.pdf?ua=1 (ultimo accesso: Marzo 2018).
 21. Lippi G, Caputo M, Banfi G, et al. Raccomandazioni per il prelievo di sangue venoso. *Biochim Clin* 2008;32:569-77.
 22. Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, et al. Survey of national guidelines, education and training on phlebotomy in 28 European countries: an original report by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PA). *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1585–93.
 23. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, et al. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *Clin Chim Acta* 2014;432:44-8.
 24. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Radeljak A, et al. Risk analysis of the preanalytical process based on quality indicators data. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:368-77.
 25. Cornes MP, Atherton J, Pourmahram G, et al. Monitoring and reporting of preanalytical errors in laboratory medicine: the UK situation. *Ann Clin Biochem* 2016;53:279-84.
 26. Scriven M. The logic and methodology of checklist, 2000 (Rivisto 2005). Western Michigan University. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.588.7093&rep=rep1&type=pdf> (ultimo accesso: Marzo 2018).
 27. Lippi G, Mattiuzzi C, Banfi G, et al. Proposta di una “checklist” per il prelievo di sangue venoso. *Biochim Clin* 2013;37:312- 7.
 28. Hales BM, Pronovost PJ. The checklist--a tool for error management and performance improvement. *J Crit Care* 2006;21:231-5.
 29. Geraghty A, Reid S, McIlhenny C. Examining patient safety attitudes among urology trainees. *BJU Int* 2014;113:167-75.
 30. Ko HC, Turner TJ, Finnigan MA. Systematic review of safety checklists for use by medical care teams in acute hospital settings--limited evidence of effectiveness. *BMC Health Serv Res* 2011;11:211.
 31. Stufflebeam DL. Guidelines for developing evaluation checklist: The checklist development checklist (CDC), 2010. https://wmich.edu/sites/default/files/attachments/u350/2014/guidelines_cdc.pdf (ultimo accesso: Marzo 2018).
 32. National Institute of Health and Clinical Excellence (NHS). Positively equal – a guide to addressing equality issues in developing NICE clinical guidelines. <https://www.nice.org.uk/process/pmg6/chapter/introduction> (ultimo accesso: Marzo 2018).
 33. Salvagno GL, Danese E, Lima-Oliveira G, et al. Avoidance to wipe alcohol before venipuncture is not a source of spurious hemolysis. *Biochem Med* 2013;23:201-5
 34. Simundic AM, Church S, Cornes MP, et al. Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines: an observational study by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1321–31.
 35. Lippi G, Favaloro EJ. Preanalytical issues in hemostasis and thrombosis testing. *Methods Mol Biol* 2017;1646:29-42
 36. Bowen RA, Sattayapiwat A, Gounden V, et al. Blood collection tube- related alterations in analyte concentrations in quality control material and serum specimens. *Clin Biochem* 2014;47:150-7.
 37. Plebani M. Towards a new paradigm in laboratory medicine: the five rights. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1881-91.

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

Carlo Scapellato¹, Fiamma Balboni^{2*}, Massimo Quercioli³, Paola Pezzati³, Giulio Toccafondi⁴, Patrizia Casprini⁵, Ada Aita⁶, Roberto Guerranti¹, Marcello Fiorini⁷, Gianni Fuzzi⁸, Alessia Tomei⁹, Riccardo Tartaglia⁴

¹UOC Patologia Clinica, Dipartimento Emergenza Urgenza e Servizi Diagnostici, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

²Laboratorio Analisi, Istituto Fiorentino Cura e Assistenza (IFCA), Firenze

³Centro Regionale di Riferimento Struttura Organizzativa Dipartimentale Sicurezza e Qualità, AOU Careggi, Firenze

⁴Centro Gestione Rischio Clinico e Sicurezza del Paziente della Regione Toscana

⁵Dipartimento Medicina di Laboratorio e Struttura Organizzativa Complessa Patologia Clinica Prato-Firenze Azienda USL Toscana Centro

⁶Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università degli Studi di Padova, Padova

⁷UOC Medicina di Laboratorio Livorno Azienda USL Toscana Nord Ovest

⁸Istituto Ricerche Cliniche "Prof. Manfredo Fanfani", Firenze

⁹Clinical Risk Manager, Istituto Fiorentino Cura e Assistenza (IFCA), Firenze

ABSTRACT

Misidentification in laboratory medicine: results of the Tuscany survey of the Clinical Risk Management Study Group SIBioC and the Italian Society of Ergonomy (SIE). In the year 2016 the Study Group on Clinical Risk Management of the SIBioC-Laboratory Medicine Society issued a joint survey with the Italian Society of Ergonomics (SIE); the survey was sent to all the clinical laboratories of the Tuscany Region in Italy. This survey had the aim to understand the level of awareness of the clinical laboratory about the clinical risk management, particularly in the patient misidentification field. The results show a very variable consciousness of the problem among different laboratories, with a very multi-faced approach to this important topic. More than the 93% of the participants state that the errors on misidentification are always registered and in the 80% the consequent actions are tracked.

INTRODUZIONE

Il rischio clinico è definito come la probabilità che un paziente sia vittima di un evento avverso imputabile alle cure prestate durante la degenza che causa un prolungamento della stessa, un peggioramento dello stato di salute o la morte. Dalla celeberrima pubblicazione "*To err is human: building a safer health system*" (1) molto è stato fatto a livello internazionale e nazionale per aumentare la sicurezza delle cure. Ciò nonostante, tutti i Paesi che si sono trovati ad affrontare questa sfida si sono resi conto che costruire un sistema sanitario più sicuro è una sfida molto più grande di quanto atteso: infatti, se da un lato le cause che conducono agli eventi avversi sono complesse, dall'altro

implementare e mantenere la sicurezza è un compito molto difficile (2).

La gestione del rischio clinico è sicuramente un sottoinsieme della gestione globale dei rischi e ne è un tassello importante in quanto prende in considerazione l'insieme complicato formato dall'essere umano e dall'ambiente in cui esso si muove e lavora, soprattutto in sistemi ad alta complessità quali quelli sanitari. La comprensione dell'interazione fra essi, dei possibili fallimenti e l'implementazione di barriere che riducono le possibilità di accadimento di eventi avversi sono tutti elementi necessari per migliorare la sicurezza delle cure (2). La filosofia del rischio clinico si basa quindi su una visione partecipata della sicurezza che coinvolga tutti gli operatori e che preveda che gli strumenti per la gestione

Corrispondenza a: Fiamma Balboni, Laboratorio Analisi Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza IFCA, Via del Pergolino 4/6, 50139 Firenze. Tel. 0554296368, fax 0554296296, e-mail lab.ifca@giomi.com

Ricevuto: 23.01.2018

Revisionato: 20.04.2018

Accettato: 24.04.2018

Publicato on-line: 08.05.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.029

del rischio, come buone pratiche e raccomandazioni, siano sperimentate sul campo dagli operatori per individuarne la fattibilità, la forza e la debolezza. Il laboratorio analisi è un microcosmo che fornisce supporto alla diagnosi e alla cura dei pazienti e, come tale, non lavora in modo a sé stante, scollegato dal resto dei percorsi clinici, ma si integra e compenetra con essi.

La gestione del rischio clinico quindi viene attuata anche in questo servizio attraverso la condivisione di procedure comuni ai differenti percorsi di cura e l'implementazione di buone pratiche e raccomandazioni per la sicurezza del paziente.

Con queste finalità, il Centro Gestione Rischio Clinico della Regione Toscana (GRC) (3) da tempo ha

Tabella 1

Domande del questionario

N.	Quesito
1	Tipologia Laboratorio
2	Numero esami anno 2015
3	Quali percorsi di qualità sono adottati presso il laboratorio?
4	L'organizzazione del laboratorio prevede la gestione della fase preanalitica di laboratorio in modo strutturato (con personale e/o strumenti dedicati)?
5	Se sì, l'attività preanalitica viene svolta in modo strutturato nelle 24 ore e 7 giorni su 7?
6	Se sì, quali di queste attività sono incluse nella fase preanalitica?
7	Come vengono gestite le non conformità (NC)?
8	Esistono nel laboratorio modalità di registrazione per l'accettazione/rigetto dei campioni non correttamente identificati (provette senza etichetta, con etichetta rovinata/parzialmente scritta, provette scritte a mano, con identificazione paziente non congruente con anagrafica)?
9	Se sì, la registrazione è?
10	I campioni non correttamente identificati come vengono gestiti?
11	Le azioni intraprese vengono tracciate?
12	Se sì, viene data comunicazione al richiedente?
13	Se sì, con quale mezzo?
14	Sono utilizzati anche parametri di delta-check per verificare la corretta identificazione del paziente (che permettano di sospettare una errata identificazione del paziente)?
15	Se sì, quali parametri vengono presi in considerazione per ipotizzare che il campione non sia quello relativo al paziente?
16	Esiste una procedura che regolamenti le azioni da intraprendere in caso di fallimento del delta-check in merito alla presunta non corretta identificazione del paziente?
17	Se sì, quale è la data dell'ultimo aggiornamento?
18	Se sì, è in uso un programma formativo per l'aggiornamento?
19	Quale è la modalità di consultazione della procedura?
20	Nel caso che il delta-check fallisca, quali azioni sono intraprese?
21	Nel caso di sospetto di scambio paziente, viene fatta segnalazione?
22	Se sì, a chi?
23	Nel caso di segnalazioni (ad esempio, sospetto scambio di paziente) vengono organizzati audit e/o rassegne mortalità-morbilità con gli operatori?
24	Se sì, vengono proposte delle azioni di miglioramento?
25	Se sì, di che tipo?
26	Nel caso di analisi proattive sistemiche, quale metodo è applicato?
27	Quanti errori di identificazione paziente sono stati rilevati lo scorso anno presso il tuo laboratorio?
28	Gli errori di identificazione paziente sono registrati presso il tuo laboratorio?
29	Ritieni sia importante registrare e monitorare il numero di errori di identificazione paziente nel tempo?
30	Conosci il modello di indicatori di qualità proposto dal gruppo di lavoro IFCC Laboratory errors and patient safety (WG-LEPS)?

lanciato una campagna per la corretta identificazione del paziente (4, 5). È intuitivo infatti come un errore di identificazione abbia un effetto potenzialmente distruttivo su tutto il percorso clinico susseguente, compreso il percorso diagnostico di laboratorio.

In quest'ottica, il Gruppo di Studio SIBioC sul Rischio Clinico ha prodotto, con la collaborazione della Società Italiana di Ergonomia (SIE), un questionario che è stato somministrato nell'anno 2016 ai laboratori pubblici e privati della Regione Toscana. L'intento era quello di verificare la conoscenza delle norme per la gestione del rischio clinico in una regione che ha una lunga storia di consapevolezza su questo tema, in quanto il GRC regionale è stato istituito nel 2003.

MATERIALI E METODI

Descrizione del questionario

Le domande del questionario sono riportate nella Tabella 1.

Le 30 domande sono tese a focalizzare, oltre ai dati demografici del laboratorio e l'eventuale adozione di norme di qualità, come sia strutturata in laboratorio la fase pre-analitica e come venga gestita la non conformità relativa alla non corretta identificazione del paziente. Sono chieste nel dettaglio le procedure intraprese quando viene riscontrato un campione che presenta un errore di identificazione, dal banale errore dovuto alla mancanza di etichetta, all'errore rilevato solo in sede di analisi dove, per fallimento di un controllo con il precedente, si ponga il sospetto di scambio di paziente al momento del prelievo.

Viene anche chiesto se si è a conoscenza del progetto IFCC denominato Errori di Laboratorio e Sicurezza del Paziente condotto dal Working Group IFCC Laboratory Errors and Patient Safety (WG-LEPS).

Il questionario è stato inviato dalla segreteria SIBioC ai referenti dei laboratori pubblici e privati della Toscana tramite la piattaforma SurveyMonkey nel periodo maggio-giugno 2016 con chiusura il 23 giugno.

Il questionario consiste in 30 domande a risposta multipla ed è stato analizzato mediante il software SurveyMonkey su piattaforma Excel.

RISULTATI

Il questionario è stato inviato a 21 partecipanti e le risposte sono state ricevute da 18 di essi, con un tasso di risposta pari all'87%. L'indagine era rivolta a strutture la cui attività copre ~70% dell'attività regionale, comprendendo i grossi gruppi privati e tutte le strutture pubbliche più rappresentative.

Il 95% dei laboratori ha risposto alle domande demografiche (17 laboratori su 18).

Dei laboratori partecipanti, il 47% è ospedaliero, il 35% privato, il 12% territoriale e il 6% ospedaliero-universitario. I laboratori che hanno risposto comprendono tutte le grandi Aziende Ospedaliere e Ospedaliero-Universitarie, i grandi laboratori territoriali e

i privati più rappresentativi con un volume complessivo di esami annuo di ~60 milioni, di cui ~40 prodotti nel settore pubblico.

14 laboratori su 18 hanno risposto alla domanda sulle norme di qualità adottate, riportando per il 71% l'aderenza alla norma UNI EN ISO 9001:2008 e UNI EN ISO 9001:2015 e per il 29% ad altre norme di qualità.

Il 56% dei laboratori dichiara di avere una fase preanalitica strutturata (risponde l'84%); in particolare, il 50% di essi nell'arco delle 24 ore e tutti i giorni dell'anno.

Le non conformità (NC) vengono gestite nell'80% dei casi con azioni correttive e quasi nel 90% con azioni preventive. Solo due laboratori implementano esclusivamente azioni correttive e solo tre esclusivamente azioni preventive.

La quasi totalità dei rispondenti (93,3%) ha dichiarato che le non conformità riguardanti la non corretta identificazione del campione sono sempre sistematicamente registrate. La gestione di questi campioni vede spesso la ri-etichettatura e la processazione del campione (75%), raramente questi campioni vengono rifiutati e rimandati al mittente (6,6%).

Nell'80% le azioni intraprese sono tracciate e in questi casi sempre ne viene data comunicazione al reparto inviante il campione. La modalità di comunicazione è nella totalità dei casi telefonica, meno del 50% utilizza la modalità informatica.

L'80% dei partecipanti utilizza parametri di confronto con i risultati precedenti (delta check) per verificare la corretta identificazione dei pazienti; di questi, la quasi totalità utilizza il volume globulare medio dei globuli rossi mentre il 60% utilizza anche parametri di chimica clinica. Sorprendentemente, anche se i parametri di delta check sono ampiamente utilizzati, solo il 30% dichiara di avere una procedura che regolamenti le azioni da intraprendere a seguito del fallimento di questo tipo di controllo. Solo il 65% dei laboratori (12 su 18) risponde alla domanda riguardante quali azioni sono intraprese a seguito di un fallimento di delta check. Di questi, circa il 70% (8 laboratori su 12) dichiara che la refertazione viene fatta inserendo una nota per il richiedente e il 25% (3 laboratori su 12) dichiara una mancata refertazione con inserimento di una nota.

È confortante che il 60% dei laboratori dichiarati che, a seguito di un errore di identificazione del paziente, venga fatta una segnalazione al sistema "Reporting and Learning System" (RLS) mediante facilitatori del rischio clinico. Questo getta sicuramente le basi affinché un'azione successiva sia intrapresa, nell'ottica del miglioramento della sicurezza del paziente. Difatti, a seguito di segnalazione, nell'88% dei casi viene organizzato un audit GRC o una rassegna di morbilità o mortalità (M&M) e nella totalità dei casi vengono implementate azioni di miglioramento, che sono nella maggioranza dei casi revisioni di procedure (85%) o attività di formazione (70%).

Il metodo di analisi maggiormente utilizzato è il "Failure Mode Effects and Criticality Analysis" (FMECA, analisi dei modi, degli effetti e della criticità dei guasti) con tecnica sistematica proattiva. FMECA è stata

indicata nel 55% delle risposte, anche se è da sottolineare che risponde a questa domanda solo il 50% dei laboratori.

15 laboratori rispondono alla domanda su quanti errori di identificazione sono stati rilevati nell'anno precedente l'indagine nel proprio laboratorio. Il 33% dichiara meno di 5, fra 5 e 10 il 20% e oltre 20 il 25%. Da segnalare che solo il 33% dei laboratori dichiara di essere a conoscenza del progetto IFCC WG-LEPS.

DISCUSSIONE

La letteratura internazionale individua nella corretta identificazione del paziente un punto cruciale per la sua sicurezza. Fra le buone pratiche viene riconosciuto l'utilizzo di braccialetti con impresso un codice a barre per evitare errori legati alla non corretta identificazione dei pazienti (5-6).

In Regione Toscana è presente dal 2008 la buona pratica denominata "Aida o Lidia perchè il paziente non è solo un nome" basata sull'introduzione del braccialetto identificativo in tutte le strutture ospedaliere regionali (4). Purtroppo, nonostante la buona pratica regionale sia in uso da molti anni, e nonostante il braccialetto identificativo sia stato adottato in quasi tutte le strutture sanitarie toscane, a tutt'oggi gli errori di identificazione sono una parte importante degli eventi segnalati al sistema regionale del rischio clinico. L'analisi di questi eventi rivela come ancora oggi l'utilizzo del numero di letto o di camera sia un riferimento comune per gli operatori addetti ai prelievi e che gli scambi di pazienti siano più frequenti a seguito di carichi di lavoro importanti e turni notturni ravvicinati. Nonostante la massiccia campagna d'informazione e la formazione a tappeto di tutti gli operatori sanitari, il problema degli errori di identificazione continua ad essere di notevole portata (7-8).

Il laboratorio analisi spesso è il punto dove tali errori sono riconosciuti. Campioni con problemi intrinseci di identificazione, come etichette anagrafiche mancanti, rotte, illeggibili o non congruenti, sono bloccati e sono intraprese azioni correttive. La quasi totalità dei laboratori (93,3%) afferma di avere una procedura da seguire in questi casi e tutti dichiarano che le azioni intraprese sono tracciate. Nella maggior parte dei casi la non conformità viene risolta e i campioni ri-etichettati sono processati e refertati. Solo il 6,6% dichiara che il campione non è analizzato e viene rimandato al richiedente. Ovviamente, questo tipo di non conformità è evidenziato e risolto dal laboratorio in quanto è il personale del laboratorio che direttamente gestisce i campioni in entrata con un check-in automatizzato o manuale. In entrambi i casi le provette con etichette non conformi sono bloccate e viene intrapresa un'azione correttiva. Il rimandare le provette al richiedente, dichiarato da quasi il 7% dei laboratori, è una pratica di dubbia utilità che probabilmente ritarda l'esecuzione di esami potenzialmente utili nel percorso clinico del paziente. Risulta sicuramente di maggiore utilità la risoluzione della NC con un'azione correttiva e la

comunicazione al richiedente di quanto intrapreso. Questa modalità dovrebbe portare all'implementazione di percorsi condivisi con i richiedenti e a eventi formativi *ad hoc* mirati a ridurre l'incidenza degli stessi (9). Desta preoccupazione il fatto che il 20% dei laboratori dichiara di non tracciare le azioni correttive intraprese: questi campioni non saranno mai più identificabili e, a seguito di un evento avverso, i dati ottenuti saranno inutilizzabili.

La comunicazione delle azioni intraprese è quasi sempre telefonica nonostante oggi i nostri sistemi informatici siano in grado di registrare questi eventi e mantenerli in memoria, cosa che renderebbe più agevole estrarre i dati per analisi statistiche.

La parte forse più interessante dell'indagine riguarda la gestione in autonomia che il laboratorio fa dei dati. Documenti internazionali spronano i laboratori in questo senso per incrementare la sicurezza del paziente come il documento EP 33 "Use of delta checks in medical laboratory" prodotto dall'Istituto per gli standard clinici e di laboratorio (CLSI) (10). La potenzialità in mano al laboratorio è enorme. Il confronto con dati precedenti su alcuni parametri che hanno elevata individualità, permette in molti casi di verificare l'identità del paziente. I delta check diventano così strumento utilissimo in grado di bloccare errori a cascata in tutto il processo clinico.

Purtroppo l'indagine mostra che, a seguito di fallimento di delta check, solo il 30% dei laboratori ha una procedura che regolamenti le azioni da intraprendere e questo fa supporre che spesso questi eventi siano lasciati alla risoluzione non strutturata dei singoli. Nel 70% dei casi comunque viene data segnalazione dell'evento al richiedente e il sistema di gestione del rischio clinico aziendale viene informato nel 60% dei casi. Difatti audit GRC o M&M sono organizzati a seguito di questi eventi nella quasi totalità dei casi, permettendo alla struttura di gestione del rischio clinico di intervenire appropriatamente. L'importanza fondamentale di eventi interdisciplinari come gli audit GRC e formativi come gli M&M è dimostrata dal fatto che ad essi seguono azioni preventive, come eventi formativi, o correttive come revisioni di procedure che hanno lo scopo di creare una cultura della sicurezza condivisa e diffusa (9). Questo tipo di incontri è importantissimo per i laboratoristi. Incontrarsi con i colleghi clinici e con gli addetti sul campo all'assistenza, come gli infermieri, getta le basi per la creazione di un percorso virtuoso in cui, imparando uno dalle esperienze dell'altro e cercando insieme soluzioni comuni, si attua l'essenza della gestione del rischio clinico (8). L'applicazione di regole precise e condivise e la partecipazione comune nell'individuazione di barriere che si oppongano all'accadimento degli eventi avversi, rappresentano la base per la gestione del rischio clinico.

Quando si rileva che più del 50% degli intervistati non risponde alla domanda su quale metodo è applicato nelle analisi proattive sistemiche, indubbiamente si mette in evidenza che questo tipo di metodologia è sconosciuta ai più e/o poco utilizzata. Tra coloro che rispondono (50%), solo poco più della metà utilizza il modello FMECA per l'analisi proattiva sistemica. È indubbio che questa

metodologia sia molto utile per le analisi proattive e che, se condotta bene, dia ottime indicazioni. Recentemente, anche l'accreditamento istituzionale al punto 6.3.8 sancisce che deve essere data evidenza di avere effettuato almeno una FMECA per anno. Probabilmente sarà necessaria un'azione formativa per permettere il raggiungimento di questo obiettivo.

Interessanti le risposte alla domanda sul numero di errori di identificazione rilevati dai laboratori nell'anno 2015. I numeri sono molto bassi a fronte di volumi di attività di svariate decine di milioni di esami eseguiti annualmente in Toscana. Come in ogni ambito clinico, il basso numero rilevato di eventi avversi risiede essenzialmente nel basso numero di segnalazioni, piuttosto che nella virtuosità dei percorsi (9).

È noto che coloro che gestiscono il rischio clinico devono costantemente spronare gli operatori sanitari alla segnalazione e che la cultura dell'imparare dall'errore va continuamente incentivata (9). Terreno fertile per questo sono le organizzazioni virtuose in cui vige la cultura della non colpevolizzazione dell'operatore che commette errori; questo tipo di cultura è tuttavia difficile da implementare e mantenere. In tutto il mondo l'utilizzo di sistemi di segnalazione e apprendimento RLS è stato incentivato, come pure lo è stato in alcune regioni Italiane. In Regione Toscana, dal 2003 il GRC incoraggia questa pratica e tutti gli operatori addetti alla gestione del rischio clinico lavorano in questo senso nelle loro strutture sanitarie (3). Ma mantenere alti livelli di segnalazione sembra purtroppo difficile.

L'ultima domanda era volta a conoscere la diffusione del progetto IFCC WG-LEPS (11). Questo progetto nasce dalla volontà di implementare la sicurezza del paziente mediante l'individuazione di indicatori di qualità per tutte le fasi del processo di laboratorio, dalla fase pre-analitica alla post-analitica. È difatti riconosciuto universalmente che risultati accurati e riportati nei tempi appropriati sono essenziali per una efficace diagnosi e trattamento dei pazienti (12). Dal momento che è stato dimostrato che la maggior parte degli errori di laboratorio avviene nelle fasi extra analitiche, è necessario conoscere a fondo tutti i diversi passaggi di queste fasi per identificare la gerarchia dei rischi e individuare azioni preventive (13).

Il progetto tuttavia è sconosciuto ancora oggi in Toscana a quasi il 70% dei laboratori, mentre una partecipazione attiva al gruppo potrebbe senza dubbio aumentare la consapevolezza in questo ambito.

CONCLUSIONI

I risultati di questo questionario, seppur limitati ad una sola regione italiana, mostrano una conoscenza multiforme del problema della corretta identificazione del paziente e una variegata risposta ad esso.

L'integrazione del laboratorio nei percorsi clinico diagnostici terapeutici assistenziali rappresenta la chiave di volta per ridurre gli errori preanalitici e per migliorare l'outcome del paziente. Solo con percorsi integrati sarà possibile migliorare la gestione del rischio clinico. La possibilità di gestire il rischio clinico congiuntamente alle strutture richiedenti, unitamente alla possibilità di interagire sull'appropriatezza delle prestazioni diagnostiche richieste, delle modalità pratiche di esecuzione nella fase preanalitica e della interpretazione dei dati e dei referti in quella post-analitica, rappresenta una opportunità di immenso valore per i pazienti e i professionisti: la creazione congiunta di un percorso virtuoso, in cui l'adozione di buone pratiche, e raccomandazioni specifiche nonché l'implementazione di procedure condivise permetterà di aumentare la sicurezza del paziente.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS. To Err is Human: Building a Safer Health System. Washington (DC): National Academies Press (US), 2000.
2. Vincent C. La sicurezza del Paziente. Milano: Springer, 2011.
3. <http://www.regione.toscana.it/centro-gestione-rischio-clinico> (Ultimo accesso: marzo 2018).
4. <http://www.regione.toscana.it/documents/10180/603668/Aida+o+Lidia.pdf/0bb1e398-4fbb-4157-8c1b-d8e056c6c855> (Ultimo accesso: marzo 2018).
5. <http://www.regione.toscana.it/-/l-identificazione-del-pazien-1> (Ultimo accesso: marzo 2018).
6. http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?lingua=italiano&id=587 (Ultimo accesso marzo 2018)
7. http://www.quadernidellasalute.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?lingua=italiano&id=1119 (Ultimo accesso: marzo 2018).
8. http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_4.jsp?lingua=italiano&tema=Qualita_e_sicurezza_delle_cure&area=qualita (Ultimo accesso: marzo 2018).
9. Tartaglia R, Vannucci A. Prevenire gli eventi avversi nella pratica clinica. Milano: Springer, 2013
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI EP 33 "Use of delta checks in medical laboratory" 2016.
11. <http://www.ifcc.org/ifcc-education-division/working-groups-special-projects/laboratory-errors-and-patient-safety-wg-leps/quality-indicators-project/> (Ultimo accesso: marzo 2018).
12. Sciacovelli L, Aita A, Padoan A, et al. Gli indicatori di qualità nel processo di armonizzazione in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:601-8.
13. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, et al. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002;48:691-8.

La procalcitonina in terapia intensiva: dubbi che rimangono?

Romolo M. Dorizzi¹, Anna Maria Azzini², Piersandro Sette³

¹Unità Operativa Complessa Patologia Clinica, Laboratorio Unico della Romagna, Pievesestina di Cesena (FC)

²Unità Operativa Complessa Malattie Infettive e Tropicali, Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Verona

³Unità Operativa Complessa Direzione Medica Ospedaliera, Azienda ULSS 9 Scaligera, Ospedale San Bonifacio (VR)

ABSTRACT

Procalcitonin in intensive care: unresolved doubts. Procalcitonin (PCT), a test marketed by some twenty years, is available virtually on all the platforms present in clinical laboratories of any size, even if its precise role is still debated. PCT is requested especially by intensive care units (ICU) and it has been included in algorithms to guide the administration of antibiotics (AB). However, several reports concluded that, despite a theoretical physio-pathological basis, there is no unambiguous evidence that the inclusion of PCT in algorithms is effective to guide AB treatment. In 2012 the Cochrane Collaboration concluded that "Further high-quality research is needed to confirm the safety of this approach in intensive care. Moreover, future studies should also establish cost-effectiveness by considering country-specific costs of procalcitonin measurement and potential savings in consumption of antibiotics and other healthcare resources, as well as secondary cost savings due to lower risk of side effects and reduced antimicrobial resistance". In 2015, the National Institute for Clinical Health Excellence concluded that the test is promising but there is still insufficient evidence to recommend its use to guide the AB treatment of sepsis in ICU. Recently, in a paper published in the *Clinical Chemistry* journal among the limiting factors preventing widespread use of PCT in sepsis and antibiotic stewardship it was included: the limited availability (and high cost) of PCT, the reluctance showed by clinicians to deescalate antibiotics based on PCT results and the uncertainty about the generalizability of previous studies results. The duration of therapy generally tends to be longer compared to what was recommended by guidelines, and PCT-guided antibiotic discontinuation may be of little benefit in hospitals where duration of therapy is already optimized.

INTRODUZIONE

L'uso della procalcitonina (PCT), la cui determinazione è stata introdotta da circa venti anni nei laboratori, è aumentato rapidamente anche perché il marcatore è oggi compreso nel pannello degli esami disponibili sulle piattaforme presenti praticamente in tutti i laboratori clinici. La PCT è richiesta soprattutto dalle unità operative di terapia intensiva anche se è stato segnalato da più parti che, nonostante una teorica fondata base fisio-patologica, non vi sono prove univoche che la sua determinazione sia efficace nella gestione del paziente settico. Molti degli articoli dedicati all'esame concludono con commenti generici come:

- una gestione degli antibiotici guidata dalla PCT potrebbe ridurre la pressione selettiva nell'era della multiresistenza (1);
- la terapia antibiotica PCT-guidata attende di essere

- valutata su un gruppo eterogeneo di pazienti, soprattutto per ragioni di sicurezza (2);
- per confermare i risultati ottenuti dal nostro studio, è auspicabile uno studio multicentrico che arruoli un numero significativo di pazienti con sepsi severa e shock settico per poter verificare il nostro protocollo basato sulla PCT e i suoi effetti sulla durata della degenza in terapia intensiva (3);
- il monitoraggio della PCT può contribuire ad ottimizzare la pressione antibiotica con effetti positivi sullo sviluppo di resistenze microbiche e sui costi della terapia intensiva (4);
- abbiamo rilevato solamente un modesto guadagno nell'utilizzare gli antibiotici nei pazienti affetti da polmonite associata alla ventilazione meccanica. Questo potrebbe trovare una spiegazione nella difficoltà d'interpretazione dei risultati delle misurazioni di PCT in questo sottogruppo di pazienti,

Corrispondenza a: Romolo M. Dorizzi, U.O.C. Patologia Clinica, Laboratorio Unico della Romagna, Piazzale della Liberazione 60, 47522 Pievesestina di Cesena (FC). Tel. 0547394809, Fax 0547394801, E-mail: romolo.dorizzi@auslromagna.it

Ricevuto: 09.01.2018

Revisionato: 07.03.2018

Accettato: 09.03.2018

Pubblicato on-line: 23.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.025

probabilmente dovuto all'elevato numero di comorbilità come pregressa risposta infiammatoria sistemica, insufficienza multiorgano, precedenti infezioni e/o interventi chirurgici, tutti fattori notoriamente in grado di aumentare i livelli circolanti di PCT (5).

Il caso della PCT è stato uno dei temi di maggiore interesse nella attività professionale degli Autori, che ha portato alla stesura di articoli che contano oggi quasi 600 citazioni (6-11) e rimane un esame che seguiamo attentamente sia dal versante laboratoristico che clinico. Le competenze clinico-laboratoristiche nel nostro gruppo ci hanno portato a proporre un uso più cauto rispetto alla nostra posizione iniziale (6-9) e a interrogarci sulla reale efficacia della PCT nell'individuazione dei pazienti settici ricoverati in terapia intensiva (10) e sul suo impiego per guidare il curante sulla durata della terapia antibiotica (11).

Può risultare esemplificativo il percorso seguito qualche anno fa quando la valutazione della richiesta di introduzione della PCT in una unità di terapia intensiva (ICU) della Romagna è stata corredata da una rassegna della Cochrane Collaboration (12) che comprende 14 trial con 4221 partecipanti, cinque di quali si sono svolti in ICU, le cui conclusioni sono state esaminate e discusse con i clinici. Gli aspetti principali di tale valutazione sono già stati pubblicati (11) e possono essere così riassunti.

In tre studi clinici è stata segnalata la presenza di un bias dovuto alla mancata segnalazione di quanti clinici non hanno seguito l'algoritmo (2, 4, 5); in altri due, l'algoritmo non è stato seguito da un'importante percentuale di clinici, ben il 53% (1) e il 19% (3). Inoltre, in tutti e cinque gli studi (1-5), sono presenti conflitti di interesse dovuti al supporto finanziario di ditte dello specifico settore diagnostico. Alcune criticità della Cochrane Collaboration ne limitano la trasferibilità e applicabilità. Per esempio: la metà degli autori della Cochrane Collaboration sono contemporaneamente anche autori degli articoli metaanalizzati e gli autori degli articoli sull'uso della PCT in ICU figurano quali revisori di sé stessi.

È da notare inoltre che gli studi sui pazienti ricoverati in ICU si riferiscono a una sottopopolazione limitata di pazienti e che la diminuzione dei giorni di somministrazione di antibiotici nei pazienti in cui la terapia è stata guidata dalla determinazione della PCT è compresa tra 1,7 e 3,5 giorni in media.

Uno dei risultati più discussi degli articoli considerati (13-17) è la mortalità più alta nel braccio di pazienti con PCT misurata rilevata da Bouadma L et al (1) (*un numero di pazienti leggermente più alto nel gruppo dei pazienti sottoposti a misura di PCT rispetto al gruppo di controllo è deceduto tra il 29° e il 60° giorno, sollevando la questione della sicurezza di utilizzare una strategia di durata della terapia antibiotica guidata dalla PCT nei reparti di terapia intensiva*).

Altrettanto importante dal punto di vista operativo è la diversità degli algoritmi proposti e l'elevata percentuale di casi in cui il clinico non si è attenuto all'algoritmo ma

ha preferito l'approccio clinico tradizionale (peraltro non definito in modo preciso o non indicato).

Non ci si sente, pertanto, di condividere le affermazioni di Jacobs L et al. (18) secondo cui, citando gli stessi articoli della Cochrane Collaboration *"la prova del fatto che gli algoritmi guidati dalla PCT riducono la durata dell'antibiotico terapia è convincente. Questo si traduce in un risparmio sulla spesa sanitaria e in un aumento del buon uso della terapia antibiotica assistita, con un conseguente calo delle resistenze. Questa indicazione non è stata adottata ovunque, ma i clinici non tarderanno ad inserirla nella loro pratica clinica basata sull'evidenza"*.

Non appaiono, infatti, conclusive anche alla luce di quanto scrive la Cochrane Collaboration, le affermazioni: *"Ulteriori studi sono necessari per confermare la sicurezza di tale approccio in Paesi non europei e nei pazienti ricoverati in terapia intensiva. Inoltre, gli studi futuri dovranno stabilire la convenienza economica, valutando i costi della determinazione della PCT in ciascun Paese e il potenziale risparmio derivante dal consumo di antibiotici e delle altre risorse sanitarie, così come i risparmi legati al minore rischio di effetti avversi e la riduzione delle resistenze antibiotiche"*.

Nel luglio 2014 il National Institute for Clinical Health Excellence (NICE) ha attivato il progetto di *"...confrontare la convenienza clinica ed economica derivante dall'uso della PCT rispetto alle pratiche cliniche standard nel trattamento con antibiotici negli adulti e nei bambini con sepsi documentata o con un forte sospetto clinico, ricoverati in terapia intensiva (19)"*. Le conclusioni dell'ottobre 2015 della NICE Guidance sottolineano che mancano ancora chiare evidenze a sostegno dell'impiego della PCT nel guidare la terapia antibiotica *I metodi per la determinazione della PCT BRAHMS (ADVIA Centaur PCT, PCT Sensitive Kryptor, Elecsys PCT, LIAISON PCT e VIDAS PCT) sembrano promettenti ma non ci sono prove sufficienti per raccomandarne l'adozione come esame di routine nel Sistema Sanitario Nazionale. Ulteriori studi sulla PCT sono raccomandati in merito alle decisioni di sospendere la terapia antibiotica in pazienti con sepsi documentata o altamente sospetta in terapia intensiva o per iniziare o non intraprendere la terapia antibiotica in pazienti che si presentino in pronto soccorso con sospetto di infezione batterica. I centri ospedalieri in cui la determinazione della PCT è routinaria sono invitati a partecipare a programmi di ricerca e di raccolta dati (19)*.

Le finalità del NICE erano diverse da quelle dei lavori precedenti e precisamente: stabilire se il Sistema Sanitario Nazionale del Regno Unito poteva/doveva aggiungere la determinazione della PCT al pannello di esami da erogare. Ha pertanto costituito un comitato di professionisti che comprendeva microbiologi, intensivisti, pediatri, laboratoristi, infermieri e ha richiesto ai produttori dei reagenti per l'esame (ThermoFisher, Roche, Siemens, Diasorin, Biomerieux) di inviare qualunque materiale ritenuto utile per dimostrare il ruolo e l'importanza dell'esame (20). NICE ha preso in esame tutto il materiale a disposizione, ne ha tenuto conto per

arrivare alla raccomandazione finale (21) e ha concluso che la PCT rimane un esame non ancora maturo per essere inserito nel Sistema Sanitario Nazionale del Regno Unito e che la riduzione del consumo di antibiotici, segnalato da alcuni autori nei pazienti inseriti in un algoritmo basato sulla determinazione della PCT, è legata più all'impiego di un protocollo clinico standardizzato piuttosto che alla misurazione della PCT. Ulteriori elementi relativi alla NICE Guidance, possono essere ricavati dal rapporto di "Health Technology Assessment" che potrebbe/dovrebbe aumentarne la conoscenza e consentire di valutarne meglio l'applicabilità (22).

NICE segnala anche che Shebabi Y et al. non avevano riportato nel loro studio, caratterizzato da una adesione molto alta all'algoritmo proposto (97%), una riduzione significativa nell'impiego degli antibiotici nel braccio in cui era misurata la PCT (23) e che lo studio randomizzato "Stop Antibiotics on guidance of Procalcitonin Study" non aveva ancora prodotto, anche se completato, nessun articolo (24).

In uno studio, pubblicato nel 2016 (25), sono stati arruolati 1575 pazienti da 15 ICU nei Paesi Bassi: in 776 la PCT era stata misurata ogni giorno e il risultato era reso disponibile al clinico entro 24 ore, mentre nel gruppo di controllo (799 soggetti) la PCT non era stata misurata. L'algoritmo adottato era lo stesso usato da Boaudma L et al (1) e il clinico poteva anche continuare a somministrare l'antibiotico dopo il raggiungimento di una delle soglie previste dall'algoritmo. Gli Autori riportano una durata della terapia antibiotica più breve di due giorni nel gruppo PCT-guidato rispetto all'altro, senza peggioramento della mortalità sia a 28 giorni che a un anno (è risultata, anzi, più bassa). Gli autori segnalano che un terzo dei pazienti randomizzati al gruppo PCT-guidato non ha partecipato allo studio perché dimesso prima della conclusione dell'algoritmo e che i clinici non hanno seguito l'algoritmo in più della metà dei casi.

Abbiamo commentato questo articolo con una lettera sullo stesso giornale con alcune delle seguenti osservazioni (11):

- la sospensione della terapia antibiotica in conseguenza della riduzione della PCT (80% rispetto al suo valore di picco o $<0,5 \mu\text{g/L}$) non prende in considerazione se il paziente critico è anche dializzato o presenta deficit della funzionalità renale/epatica che possono influenzare la cinetica della PCT;
- da un punto di vista infettivologico l'articolo fa presumere che non ci sia certezza nella diagnosi di infezione, e indica numerose infezioni polmonari (verosimili basse vie respiratorie) e endo-addominali (peritoniti? di che tipo? con raccolte?). Pochissime sono invece le batteriemie/infezioni catetere correlate (primitive o secondarie ad altro focolaio infettivo) che rappresentano l'emblema dell'episodio settico;
- è condivisibile sospendere la terapia, anche con PCT diminuita, in un paziente in cui l'infezione sistemica

sia sicuramente controllata ma non vi sia certezza che il focolaio di partenza sia ben controllato (come nelle raccolte ascessuali non drenate/drenabili), o sia localizzato in un tessuto ove gli antibiotici penetrano scarsamente (polmone/sistema nervoso centrale) o vengano in parte inattivati (ad esempio nelle raccolte ascessuali). In questi casi alla sospensione dell'antibiotico il paziente può tornare febbrile o presentare, addirittura, una ri-positivizzazione degli esami colturali;

- circa un quarto dei pazienti (di entrambi i gruppi) è stato sottoposto a un ciclo aggiuntivo di terapia antibiotica in media dopo 5 giorni dal primo; il 5% dei pazienti nel braccio PCT-guidato (il 3% nell'altro braccio) ne ha assunto successivamente un terzo ciclo per una re-infezione. Se ne deduce che il primo ciclo di terapia non è stato efficace almeno in 1 caso su 4.

Altri studi meritevoli di attenzione sono quello di Annane D et al. (26) e quello di Brechot N et al. (27); i primi riportano che un algoritmo basato sulla PCT non influenza l'uso di antibiotici e i secondi che l'algoritmo PCT-guidato non porta alla riduzione del consumo di antibiotici e che solo il 46% dei pazienti con bassa PCT non riceve antibiotici. Secondo questi autori, la riluttanza dei clinici a guidare l'antibiotico-terapia sulla scorta della concentrazione di PCT nei pazienti critici dipende dalla bassa accuratezza del biomarcatore nel rilevare l'infezione batterica.

Prkno A et al. (28) sottolineano le differenze sostanziali tra i diversi algoritmi proposti che dovranno essere risolte negli studi futuri "*Valori soglia affidabili delle concentrazioni di PCT utili per guidare le decisioni terapeutiche devono essere definiti con studi futuri, poiché gli algoritmi dei trattamenti analizzati nella nostra revisione sistematica sono molto diversi...*"

Particolarmente interessante tra i numerosi commenti a questa rassegna quello di Salluh JI et al. (29) "*Nonostante il loro importante contributo, la maggior parte degli studi che valutano l'antibiotico-terapia PCT-guidata presentano numerose limitazioni che ne impediscono l'applicazione sicura al processo decisionale clinico. Ad esempio, l'elevata percentuale di esclusione dei pazienti e di mancata adesione all'algoritmo studiato [fino a $>50\%$ nel trial PRORATA (1)], la mancata valutazione dell'effetto dell'insufficienza renale e della terapia sostitutiva renale sulla concentrazione di PCT, l'elevata eterogeneità della durata della terapia antibiotica nei pazienti-controllo*".

Nel 2017 lo stesso gruppo ha esteso e precisato gli aspetti che riducono il valore degli algoritmi proposti; in particolare gli autori hanno ribadito che negli studi relativi alla PCT (30):

- la durata della terapia standard del gruppo di controllo è più lunga di quella considerata come efficace dalla Buona Pratica Clinica;
- i criteri di esclusione dai trial sono estremamente eterogenei e la percentuale di esclusione è elevata ($>35\%$);
- spesso il clinico non segue l'algoritmo (l'adesione

arriva solo alla metà dei casi in molti casi).

Nello stesso anno Moran JL et al (31) osservano che l'applicazione di algoritmi basati sulla PCT richiedono ulteriori valutazioni; anche ammettendo che il risparmio della spesa antibiotica fosse di 34 €/paziente, verrebbe pareggiato solo nel caso in cui il costo per la misurazione della PCT fosse pari al massimo a 4 €/esame mentre per il laboratorio usato dagli autori (e non solo) è 10 volte più alto. Gli Autori concludono che: *"I benefici derivanti dalla terapia antimicrobica guidata dai valori di PCT sono ancora incerti e sembrano dipendere anche dai costi e dalle diverse organizzazioni sanitarie adottate"*.

La rassegna sistematica di Wacker C et al. (32) è una delle poche che impiega gli strumenti proposti dalla medicina basata sulle prove di evidenza (EBM) come il likelihood ratio (LR) che conferma l'interesse più teorico-speculativo che pratico-operativo della determinazione di PCT. Le consuete conclusioni circa la difficoltà di attribuire alla PCT il ruolo di test definitivo per la diagnosi di sepsi, sono corroborate da semplici ma efficaci argomentazioni EBM. Ribadite le limitazioni che la grande differenza di valori soglia impiegati (mediana di 1,1 µg/L) introducono nella valutazione di algoritmi clinici, gli autori ottengono una sensibilità e una specificità combinata dei 22 studi sottoposti a metanalisi rispettivamente del 77% e del 79% con un LR positivo di 3,67 e un LR negativo di 0,29, entrambi ben distanti da quelle ottimali. Se si impiegasse il nomogramma di Fagan o, comunque, un approccio bayesiano, all'interno del processo diagnostico, a quali conclusioni potrebbe arrivare il clinico, il paziente o l'amministratore di una azienda sanitaria considerando che in un paziente la probabilità pre-test di sepsi, pari al 10% sulla scorta della sola clinica, può aumentare al 29% in caso di PCT positiva o scendere al 3% con un risultato negativo, mentre in un paziente con un quadro clinico più incerto e una probabilità pre-test di sepsi del 50% un risultato di PCT positivo la porta al 79% e uno negativo la riduce al 22%? Si può considerare questa una percentuale sufficiente per sospendere la terapia antibiotica?

Le conclusioni di altre due Cochrane Collaboration del 2017 (33, 34) sull'impiego della PCT in scenari clinici diversi (pazienti ospedalizzati, pazienti in ICU, pazienti in medicina di emergenza) che hanno impiegato algoritmi e valori soglia differenti sono state diverse. Secondo Andriolo BN et al. (33) non ci sono al momento prove a sostegno dell'approccio PCT-guidato alla terapia antibiotica nel ridurre mortalità, ventilazione meccanica o durata della terapia nella sepsi. Qualche mese dopo Schuetz P et al. (34) hanno concluso che l'impiego della PCT diminuisce la mortalità, il consumo di antibiotici e il rischio di effetti collaterali degli stessi in caso di infezioni respiratorie acute anche se sottolineano la necessità di ulteriori indagini e, soprattutto, di considerare altri tipi di infezioni e soggetti immunodepressi.

A fine dicembre 2017 è stato pubblicato uno studio (35) condotto dall'industria (nove dei dieci autori dell'articolo sono o sono stati alle dipendenze, direttamente o indirettamente, di aziende di diagnostici e tutti hanno avuto supporto finanziario da queste) a fini

registrativi presso la Food and Drug Administration statunitense. Secondo questo studio, la durata della terapia antibiotica è risultata di 7,35 giorni nei pazienti con sepsi gestiti con un approccio PCT-guidato e di 8,85 giorni in quelli per i quali la PCT non è considerata, senza variazioni della mortalità e della durata del ricovero. Lo studio ribadisce ancora una volta la necessità di ulteriori studi per valutare l'impatto della PCT nella riduzione dell'incidenza di effetti avversi legati all'uso degli antibiotici.

Non sembra quindi che l'auspicio del luglio 2012 del Technology Assessment Unit (TAU) della McGill University Health Centre si sia realizzato (36). All'epoca, il TAU aveva documentato che misure seriate di PCT potevano ridurre la somministrazione di antibiotici ma non c'erano prove di differenze nell'outcome di pazienti clinicamente confrontabili e raccomandava di rimandare la decisione sull'introduzione dell'esame al momento in cui fossero stati disponibili i risultati di studi randomizzati. D'altro canto, troviamo sempre più spesso articoli che affrontano aspetti organizzativi ed economici come l'elevato costo dei reagenti per l'analisi della PCT (37).

Le risposte alle domande che sono state poste a cinque esperti nella sezione "Questions and Answers" del fascicolo di settembre 2017 di Clinical Chemistry (38) sono chiare: confermano che la PCT è promettente quale biomarcatore per la diagnosi, la prognosi, il monitoraggio della sepsi anche se sensibilità e specificità sono molto variabili, a causa dell'eterogeneità dei pazienti in cui è utilizzata. Il suo impiego è fortemente limitato dal fatto che i suoi valori da un lato aumentano in modo aspecifico in molte condizioni infiammatorie e nel post-operatorio e dall'altro si riducono in caso di episodi infettivi virali o in infezioni batteriche localizzate. La scarsa adesione agli algoritmi proposti in letteratura, la dipendenza dal valore soglia adottato dai diversi autori per stabilirne un valore prognostico variabile, il costo elevato dell'esame e la sua non disponibilità nelle 24 ore, contribuiscono ulteriormente a renderla un marcatore dall'impiego poco standardizzabile.

Probabilmente, dove l'impiego degli antibiotici è molto appropriato, il vantaggio apportato da algoritmi PCT-guidati può essere modesto. Gli esperti raccomandano una severa e attenta selezione dei pazienti su cui eseguire l'esame prima di introdurre la determinazione della PCT in laboratorio e di verificare, al termine della sperimentazione, i vantaggi realmente ottenuti.

Le modalità con cui la determinazione della PCT è stata introdotta nell'Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) della Romagna nel giugno 2017 corrispondono a tali raccomandazioni (38). È stato definito e condiviso con i clinici delle unità operative di terapia intensiva dell'AUSL della Romagna un algoritmo che tenga conto della letteratura e che possa aiutare a valutare l'impatto che la disponibilità dell'esame ha avuto. È stata accolta la proposta dei direttori delle unità di terapia intensiva di impiegare l'esame in *"Un quadro di sepsi grave, già in terapia antibiotica, con l'obiettivo di verificare anche attraverso la curva delle concentrazioni di PCT l'efficacia*

della terapia nell'ottica di una limitazione della durata della stessa”.

La determinazione della PCT è stata così resa disponibile ai soli pazienti critici con un quadro di sepsi grave /shock settico all'ingresso e la PCT non è utilizzata per la diagnosi di infezione e nelle infezioni circoscritte, anche se di origine batterica (ad esempio infezioni osteoarticolari croniche, empiemi, versamenti saccati) secondo il seguente algoritmo condiviso, che comprende: la determinazione della PCT al momento del sospetto clinico, e la determinazione della PCT a intervalli di 48 ore (ovvero fino alla riduzione della PCT a 0,1 µg/L o del 90% rispetto al valore di base). La richiesta della misura di PCT (al massimo quattro determinazioni per paziente) si interrompe se è venuto meno il sospetto clinico di sepsi di tipo infettivo o se è stata identificata un'altra causa di sepsi. Sono in corso di valutazione i risultati dopo sei mesi di applicazione dell'algoritmo.

Non è incoraggiante concludere che, dopo quasi venti anni di impiego di questo esame, siamo rimasti a questo punto.

Nonostante la ricca bibliografia sull'argomento la sintesi più efficace può essere trovata in fonti bibliografiche secondarie come Dynamed che riassume le indicazioni per il medico pratico in modo del tutto condivisibile:

- non sono stati ancora definiti valori decisionali di PCT e frequenza di monitoraggio ottimali;
- in molti tipi di infezione, l'impiego rimane nell'ambito della ricerca;
- i risultati devono essere valutati con cautela nel contesto clinico (39).

In quest'ottica, la PCT sembra assumere più il ruolo di una sirena sugli scogli piuttosto che quello di un faro sicuro nella nebbia della diagnosi in cui spesso si trova avvolto il clinico nella sua attività quotidiana. L'opinione personale degli Autori è che, nel momento in cui sono messi a disposizione del laboratorio e del clinico, esami in biologia molecolare capaci di identificare in pochi minuti l'organismo patogeno presente nel campione (sangue, liquor, feci, secrezioni respiratorie), a meno di un riposizionamento dei biomarcatori in termini clinici, organizzativi ed economici, i dubbi di oggi resteranno ancora irrisolti per molti anni (40, 41).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Bouadma L, Luyt CE, Tubach F, et al. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010;375:463-74.
2. Hochreiter M, Kohler T, Schweiger AM, et al. Procalcitonin to guide duration of antibiotic therapy in intensive care patients: a randomized prospective controlled trial. *Critical Care* 2009;13:R83.
3. Nobre V, Harbarth S, Graf JD, et al. Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;177:498-505.
4. Schroeder S, Hochreiter M, Koehler T, et al. Procalcitonin (PCT)-guided algorithm reduces length of antibiotic treatment in surgical intensive care patients with severe sepsis: results of a prospective randomized study. *Langenbecks Archives of Surgery* 2009;394:221-6.
5. Stolz D, Smyrniotis N, Eggimann P, et al. Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in ventilator-associated pneumonia: a randomised study. *Eur Respir J* 2009;34:1364-75.
6. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, et al. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:1737-41.
7. Dorizzi RM, Polati E, Sette P, et al. Procalcitonin in the diagnosis of inflammation in intensive care units. *Clin Biochem* 2016; 39:1138-43.
8. Santuz P, Soffiati M, Dorizzi RM, et al. Procalcitonin for the diagnosis of early-onset neonatal sepsis: a multilevel probabilistic approach. *Clin Biochem* 2008;41:1150-5.
9. Sette P, Dorizzi RM, Azzini AM. The Web in the management of biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:3189.
10. Dorizzi RM, Sette P. La procalcitonina in ICU: un grande futuro alle spalle? *Rivista Italiana di Medicina di Laboratorio* 2016;12:1-8.
11. Dorizzi RM, Azzini AM, Sette P. Procalcitonin to guide antibiotic stewardship in intensive care. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 889.
12. Schuetz P, Müller B, Christ-Crain M, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;9:CD007498.
13. Kollef MH. Will procalcitonin reduce antibiotic use in intensive care? *Lancet* 2010;375:435-6.
14. Mokart D, Leone M. Procalcitonin in intensive care units: the PRORATA trial. *Lancet* 2010;375:1605.
15. Gibot S. Procalcitonin in intensive care units: the PRORATA trial. *Lancet* 2010;375:1605-6.
16. Landman GW, Kleefstra N. Procalcitonin in intensive care units: the PRORATA trial. *Lancet* 2010;375:1606.
17. Tarnow-Mordi W, Gebski V. Procalcitonin in intensive care units: the PRORATA trial. *Lancet* 2010;375:1605.
18. Jacobs L, Wong HR. Emerging infection and sepsis biomarkers: will they change current therapies? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016;14:929-41.
19. NICE Procalcitonin testing for diagnosing and monitoring sepsis (ADVIA Centaur BRAHMS PCT assay, BRAHMS PCT Sensitive Kryptor assay, Elecsys BRAHMS PCT assay, LIAISON BRAHMS PCT assay and VIDAS BRAHMS PCT assay). *Diagnostics guidance*. <https://www.nice.org.uk/guidance/dg18> (ultimo accesso: dicembre 2017).
20. Diagnostic Assessment Report commissioned by the NIHR HTA Programme on behalf of the National Institute for Health and Clinical Excellence—Protocol. NICE <https://www.nice.org.uk/guidance/DG18/documents/diagnosis-and-monitoring-of-sepsis-procalcitonin-testing-final-protocol2> (ultimo accesso: dicembre 2017).
21. Diagnostics Assessment Programme. <https://www.nice.org.uk/guidance/DG18/documents/consultation-comments-and-response> (ultimo accesso: dicembre 2017).
22. Westwood M, Ramaekers B, Whiting P, et al. Procalcitonin testing to guide antibiotic therapy for the treatment of sepsis in intensive care settings and for suspected bacterial infection in emergency department settings: a

- systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 2015;19:1-236.
23. Shehabi Y, Sterba M, Garrett PM, et al. Procalcitonin algorithm in critically ill adults with undifferentiated infection or suspected sepsis. A randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1102-10.
 24. Assink-de Jong E, de Lange DW, van Oers JA, et al. Stop Antibiotics on guidance of Procalcitonin Study (SAPS): a randomised prospective multicenter investigator-initiated trial to analyse whether daily measurements of procalcitonin versus a standard-of-care approach can safely shorten antibiotic duration in intensive care unit patients - calculated sample size: 1816 patients. *BMC Infect Dis* 2013;13:178.
 25. De Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis* 2016;16: 819-27.
 26. Annane D, Maxime V, Faller JP, et al. Procalcitonin levels to guide antibiotic therapy in adults with non-microbiologically proven apparent severe sepsis: a randomised controlled trial. *BMJ Open* 2013;3(2). doi: 10.1136/bmjopen-2012-002186.
 27. Bréchet N, Hékimian G, Chastre J, et al. Procalcitonin to guide antibiotic therapy in the ICU. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46(Suppl. 1):S19-24.
 28. Prkno A, Wacker C, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock—a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2013;17:R291.
 29. Salluh JI, Nobre V, Povoia P. Using procalcitonin to guide antimicrobial duration in sepsis: asking the same questions will not bring different answers. *Crit Care* 2014; 18:142.
 30. Nora D, Salluh J, Martin-Loeches I, et al. Biomarker-guided antibiotic therapy—strengths and limitations. *Ann Transl Med* 2017;5:208.
 31. Moran JL, Solomon PJ. Procalcitonin as a biomarker for infection and sepsis: yet again. *Pulm Crit Care Med* 2017;2:1-3.
 32. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013;13:426-35.
 33. Andriolo BN, Andriolo RB, Salomão R, et al. Effectiveness and safety of procalcitonin evaluation for reducing mortality in adults with sepsis, severe sepsis or septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2017 Jan 18;1:CD010959.
 34. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;10:CD007498.
 35. Iankova I, Thompson-Leduc P, Kirson NY et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in patients with suspected or confirmed sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2017. doi: 10.1097/CCM.0000000000002928.
 36. Sinclair A, Dendukuri N, McGregor M. Use of serum procalcitonin levels in treatment decisions for adult patients in the intensive care unit. Montreal (Canada): Technology Assessment Unit (TAU) of the McGill University Health Centre (MUHC); 2012 Jul 17. Report no. 62. 33 p. https://secureweb.mcgill.ca/tau/sites/mcgill.ca/tau/files/muhc_tau_2012_62_procalcitonin.pdf (ultimo accesso: dicembre 2017).
 37. Kip MMA, Kusters R, Ijzerman MJ, et al. A PCT algorithm for discontinuation of antibiotic therapy is a cost-effective way to reduce antibiotic exposure in adult intensive care patients with sepsis. *J Med Econ* 2015;18:944-53.
 38. Fung AWS, Beriault D, Diamandis EP, et al. The Role of Procalcitonin in diagnosis of sepsis and antibiotic stewardship: opportunities and challenges. *Clin Chem* 2017;63:1437-41.
 39. Dynamed. Procalcitonin-guided antibiotic therapy. <http://web.ebscohost.com/dynamed/detail?vid=2&sid=86384960-e442-4afd-97f0-45591e6abc30%40pdc-v-sessmgr01&bdata=JnNpdGU9ZluYW1lZC1saXZlJnNjb3B1PXNpdGU%3d#AN=474234&db=dme> (ultimo accesso: dicembre 2017).
 40. Rollins G. The Infectious Diseases Diagnostic Revolution. How quickly will new methods replace culture? *Clinical Laboratory News* <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2014/may/infectious-diseases> (ultimo accesso: marzo 2018).
 41. Messacar K, Parker SK, Todd JK, et al. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *J Clin Microbiol* 2017;55:715-23.

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

Francesca Duraturo¹, Paola Izzo^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche e ²CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università Federico II, Napoli

ABSTRACT

Detection analysis of microsatellite instability status for the diagnosis and therapy of Lynch syndrome-related cancers. Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominant genetic disorder that is characterized by an increased risk of developing colorectal cancer. LS is associated with germline mutations in DNA mismatch repair genes (MMR) that are involved in the correction of nucleotide misalignments that may arise during DNA replication. The deficiency of the MMR complex results in a high rate of mutations in repetitive DNA sequences known as microsatellites; these, because of their structure, are more prone to errors during replication. This condition is known as microsatellite instability (MSI) and is present in about 95% of the tumors associated with LS. MSI analysis is used for making clinical diagnosis of LS. All the individuals showing MSI-high status on the tumor tissue should undergo to genetic testing to identify pathogenetic mutation in one of the MMR genes. The identification of the mutation allows making an early diagnosis, in individuals belonging to families at risk. Moreover, the MSI testing in addition to the key role in the molecular diagnosis of LS, has also a very important role in identifying the most appropriate therapeutic approach for LS patients. Recently, novel therapeutic approaches such as immunotherapy, which represent a viable alternative to traditional therapeutic methods, give a good life expectancy to patients showing a MSI-high status, who have already developed a LS-related cancer. In this paper, through a review of the most recent literature, we present this dual role of MSI analysis in Lynch syndrome.

La sindrome di Lynch, nota anche come cancro ereditario del colon non-poliposico (HNPCC, dall'acronimo inglese), è associata a mutazioni germinali nei geni della riparazione del DNA (Mismatch Repair, MMR), in particolare *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Altri due geni *MMR* meno coinvolti nella patogenesi della sindrome di Lynch sono i geni *MLH3* e *MSH3* (1, 2, 3). La sindrome di Lynch è una malattia genetica con un'ereditarietà autosomica dominante e una penetranza del 80-90%. È caratterizzata da un elevato rischio (20-70%) di sviluppare tumori del colon-retto, nonché tumori in sedi extra-coliche, quali il cancro dell'endometrio con un rischio che va dal 15 al 70%, tumori renali, uretere, vie biliari e piccolo intestino, con un rischio complessivo di ~15%. Di solito i tumori del colon-retto tipici della sindrome di Lynch mostrano un esordio precoce (~42 anni) rispetto ai tumori colon-rettali sporadici (~69 anni) e hanno una prognosi migliore (4). La maggior parte dei pazienti con la sindrome di Lynch presenta una mutazione germinale

patogenetica nei geni *MLH1* e *MSH2*, mentre mutazioni negli altri geni *MMR* (*PMS2*, *MSH6*, *MLH3* e *MSH3*) rendono conto di un complessivo 10-13% dei casi (5). La presenza di una mutazione patogenetica in uno dei geni *MMR* determina la perdita di funzione dell'allele del relativo gene. L'inattivazione somatica del corrispondente allele "wild-type", che si verifica in seguito a mutazioni puntiformi o perdita (parziale) del gene, determina l'inattivazione bi-allelica a livello tissutale e porta quindi alla completa abolizione della funzione proteica. Poiché le proteine MMR sono coinvolte nella correzione degli appaiamenti errati di singoli nucleotidi e di piccole inserzioni/delezioni che possono insorgere durante la replicazione del DNA, l'inattivazione di queste proteine si traduce in un sistema di riparazione del DNA difettoso.

I microsatelliti, corte sequenze di DNA ripetute da 15 a 30 volte e disperse nel genoma umano, proprio per la loro natura, sono maggiormente esposti a variazioni della loro lunghezza durante la replicazione; il mancato

Corrispondenza a: Paola Izzo, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", Via Pansini 5, 80131 Napoli. Tel. 08174641, Fax 08176439, E-mail: paola.izzo@unina.it

Ricevuto: 07.03.2018

Revisionato: 29.03.2018

Accettato: 17.04.2018

Pubblicato on-line: 09.05.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.030

funzionamento del sistema di riparazione *MMR* impedisce la correzione di questi errori favorendo l'instabilità delle sequenze microsatellite. Pertanto, l'instabilità dei microsatelliti (microsatellite instability, MSI) può essere considerata come un marcatore del mancato funzionamento del sistema di riparazione *MMR*. La MSI è stata riscontrata in ~90-95% dei tumori correlati alla sindrome di Lynch e nel 15% dei tumori colon-rettali sporadici (6).

Nei tumori correlati alla sindrome di Lynch circa il 95% dei casi di MSI è dovuto alla perdita di espressione dei geni *MLH1* (45%), *MSH2* (40%), *MSH6* (10%) o *PMS2* (5%). Invece, nei tumori sporadici, la MSI è data dalla perdita della funzione di *MLH1* dovuta all'ipermetilazione del suo promotore che causa quindi un meccanismo di silenziamento genico (7).

E' possibile definire il grado di MSI del relativo tumore considerando il numero di ripetizioni microsatellitari instabili. Per la determinazione della MSI è possibile analizzare, sul DNA estratto dal tessuto tumorale, un pannello, noto come pannello di Bethesda, di cinque microsatelliti comprendenti due ripetizioni mononucleotidiche (BAT-25 e BAT-26) e tre ripetizioni dinucleotidiche (D2S123, D5S346 e D17S250). Tumori con instabilità in due o più di queste ripetizioni sono definiti ad alta instabilità (MSI-High); quelli con una ripetizione instabile sono detti a bassa instabilità (MSI-Low); tumori senza alterazioni sono stabili (MSI-Stable) (8).

Le recenti linee guida previste per la diagnosi della sindrome di Lynch suggeriscono l'analisi di questo gruppo di microsatelliti in tutti i casi di tumore colon-rettale insorto in soggetti con un'età inferiore a 50 anni, anche senza familiarità per patologie tumorali, e sui carcinomi colon-rettali sincroni e metacroni o con familiarità e con altri tumori associati alla sindrome di Lynch, indipendentemente dall'età (4).

Tutti i soggetti che mostrano MSI sul tessuto tumorale sono sottoposti al test genetico per la ricerca di mutazione in uno dei geni *MMR*. L'identificazione della mutazione permette di effettuare la diagnosi precoce, negli individui appartenenti a famiglie a rischio. I portatori di mutazione patogenetica in uno dei geni *MMR* dovranno sottoporsi a un programma di sorveglianza clinica, specifico per i soggetti affetti da sindrome di Lynch (4).

Il test MSI oltre al ruolo chiave che riveste nella diagnosi molecolare della sindrome di Lynch, ha anche una funzione molto importante nel suggerire l'eventuale approccio terapeutico da seguire per i soggetti che presentano un tumore colon-rettale "MSI-High", infatti la determinazione dell'instabilità molecolare è stata considerata come un marcatore prognostico dei tumori correlati alla sindrome di Lynch. Consistenti dati di letteratura confermano che i soggetti affetti da sindrome di Lynch o che sviluppano tumori colon-rettali "MSI-High" rispetto ai tumori colon-rettali "MSI-Low" e "MSI-Stable", sono associati a una prognosi favorevole quando non sono sottoposti a trattamento con 5-fluorouracile (9), che rappresenta il farmaco chemioterapico più utilizzato

per il tumore del colon-retto. Ciò può essere spiegato considerando che i tumori MSI dovuti al mancato funzionamento delle proteine *MMR* (ovvero tipici della sindrome di Lynch) presentano istologicamente molto spesso una spiccata reazione linfocitaria che indicherebbe una risposta immunitaria contro tali tumori, la quale potrebbe essere abrogata dagli effetti immunosoppressivi di questa specifica chemioterapia (9). Inoltre, le cellule con una deficienza del sistema di riparazione *MMR* accumulano mutazioni nelle sequenze microsatelliti e queste si possono ritrovare anche in regioni codificanti di geni rilevanti per il processo di tumorigenesi. Queste mutazioni possono dare origine a una perdita di funzione delle rispettive proteine di tali geni, ma possono anche innescare la traduzione di neopeptidi o antigeni "frameshift" altamente immunogenici (frameshift specific peptides, FSP). Questi antigeni FSP derivano da slittamenti della cornice di lettura derivanti da inserzioni o delezioni di singoli nucleotidi nella sequenza codificante dei rispettivi geni; questo crea sequenze amminoacidiche insolite. La presenza di questi neo-antigeni nei tumori MSI potrebbe spiegare la caratteristica patologica di questi tumori che mostrano una massiccia infiltrazione di linfociti e altre cellule immuno-correlate che indicherebbero la forte immunogenicità di tali tumori (10). Dati recenti di letteratura mostrano che un sottogruppo di pazienti con tumore MSI risponde particolarmente bene al trattamento con inibitori del controllo immunitario. I checkpoint immunitari giocano un ruolo chiave nel limitare le risposte immunitarie antitumorali, come quelle dirette contro l'antigene T-linfocitario citotossico 4 (CTLA-4) e il recettore programmato di morte cellulare (PD-1) e il suo ligando, PD-L. Il blocco di questa via da parte degli anticorpi anti-PD-1 impedisce la down-regulation delle funzioni effettrici delle cellule T e consente a esse di mantenere la funzionalità antitumorale e la capacità di mediare la morte delle cellule tumorali. Recentemente, agenti inibitori del checkpoint immunitario, come Pembrolizumab che è un anticorpo anti-PD-1, sono stati sviluppati come farmaci antitumorali e sembrano molto promettenti proprio nei pazienti con tumori colon-rettali "MSI-High" (11). L'immunoterapia rappresenta dunque una buona speranza di sopravvivenza per i pazienti con la sindrome di Lynch che presentano tumori anche in stadi avanzati e, sono quindi, un valido approccio terapeutico. Inoltre, questo nuovo approccio terapeutico andrà a beneficio di tutti coloro che sviluppano un carcinoma del colon sporadico con uno stato "MSI-High" a livello somatico.

Pertanto, la determinazione dello stato MSI sul tessuto tumorale colon-rettale fornisce informazioni molto importanti sia per porre una diagnosi di malattia ereditaria, come la sindrome di Lynch, sia per l'eventuale trattamento di tumori colon-rettali sporadici con uno stato "MSI-High". Questo permetterà di procedere con un approccio medico del trattamento dei tumori sempre più personalizzato (12).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Liccardo R, De Rosa M, Rossi GB, et al. Incomplete Segregation of MSH6 Frameshift Variants with Phenotype of Lynch Syndrome. *Int J Mol Sci* 2017;18:999.
2. Duraturo F, Liccardo R, Izzo P. Coexistence of MLH3 germline variants in colon cancer patients belonging to families with Lynch syndrome-associated brain tumors. *J Neurooncol* 2016;129:577-8.
3. Duraturo F, Liccardo R, Cavallo A, et al. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: probability of synergistic effects. *Int J Cancer* 2011;129:1643-50.
4. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1159-79.
5. Liccardo R, De Rosa M, Izzo P, et al. Novel Implications in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome. *Gastroenterol Res Pract* 2017;2017:2595098.
6. Vilar E, Mork ME, Cuddy A, et al. Role of microsatellite instability-low as a diagnostic biomarker of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Cancer Genet* 2014;207:495-502.
7. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18:1506-12.
8. Duraturo F, Liccardo R, Cavallo A, et al. Multivariate analysis as a method for evaluating the pathogenicity of novel genetic MLH1 variants in patients with colorectal cancer and microsatellite instability. *Int J Mol Med* 2015;36:511-7.
9. Li LS, Morales JC, Veigl M, et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2009;158:679-92.
10. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008;134:988-97.
11. O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One* 2017;12:0189848.
12. De Rosa M, Rega D, Costabile V, et al. The biological complexity of colorectal cancer: insights into biomarkers for early detection and personalized care. *Therap Adv Gastroenterol* 2016;9:861-6.

Valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura delle troponine cardiache I e T: dalla teoria alla pratica di laboratorio. Documento congiunto del Gruppo di Studio Biomarcatori Cardiovascolari di SIBioC-Medicina di Laboratorio ed European Ligand Assay Society (ELAS)*

Aldo Clerico¹, Martina Zaninotto², Silvia Masotti¹, Veronica Musetti¹, Concetta Prontera¹, Andrea Ripoli¹, Monica Mion², Claudio Passino¹, Mario Plebani²

¹Fondazione CNR Regione Toscana G. Monasterio e Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Italy

²Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

ABSTRACT

Evaluation of analytical performance of immunoassay methods for cardiac troponin I and T: from theory to laboratory practice. Joint document of SIBioC and European Ligand Assay Society. All the national and international guidelines recommend that cardiac troponins (cTnI and cTnT) should be considered the preferred biomarkers for the differential diagnosis of acute coronary syndrome (ACS), and also that the 99th upper reference population limit (URL) value for cardiac troponins should be measured with an imprecision ≤ 10 CV%. Indeed, the measurement of the 99th URL of cTnI and cTnT is a very hard analytical challenge due to low biomarker concentrations in healthy subjects. For this reason, only after the year 2006, some manufacturers set up the first new generation of cTnI and cTnT immunoassays with improved analytical sensitivity in accordance with the quality specifications indicated by international guidelines. The most recent international guidelines recommend that immunoassays for cTnI and cTnT measurement, able to completely satisfy these quality specifications, should be defined high-sensitivity methods. These methods should be preferred for early diagnosis of ACS syndrome and also for stratification of cardiovascular risk in both general population and cardiac patients. Therefore, understanding the analytical performance of immunoassay methods for cTnI and cTnT, especially at the low normal concentration range, is critically important for both laboratory professionals and clinicians. The aim of this document is to discuss some theoretical considerations related to the definition of analytical sensitivity, as well as some critical aspects concerning the experimental protocols commonly adopted for evaluation and comparison of analytical performances of cardiac troponin immunoassays.

SCOPO DEL DOCUMENTO

Pochi metodi, attualmente disponibili in commercio, sono in grado di soddisfare del tutto le specifiche di qualità richieste dalle linee guida internazionali per la misura delle troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) (1-9). Di conseguenza, i laboratori clinici non solo devono richiedere e ottenere informazioni sulle caratteristiche analitiche dei metodi per cTnI e cTnT dalle aziende produttrici e distributrici dei sistemi analitici, ma anche essere in grado di valutare e confrontare correttamente i parametri di sensibilità analitica e di riproducibilità dei

differenti metodi. Il compito dei laboratori clinici è particolarmente arduo perché le caratteristiche dei metodi immunometrici per questi analiti sono molto difficili da valutare sperimentalmente, date le basse concentrazioni di cTnI e cTnT circolanti nei soggetti adulti sani, e anche perché la definizione di sensibilità analitica di questi metodi di misura presenta limitazioni teoriche che condizionano lo sviluppo di protocolli sperimentali omogenei di valutazione.

Scopo di questo documento è quello di discutere le criticità presenti sia nella definizione teorica di sensibilità analitica dei metodi immunometrici per la misura delle

*Questo articolo è pubblicato simultaneamente da *Biochimica Clinica* e *Ligand Assay*.

Corrispondenza a: Aldo Clerico, Medicina di Laboratorio, Fondazione CNR Toscana G. Monasterio, Scuola Superiore Sant'Anna, Via Trieste 41, 56126 Pisa. Tel. 0503152133, Fax 0503153454, E-mail clerico@ftgm.it

Ricevuto: 06.02.2018

Revisionato: 29.03.2018

Accettato: 03.04.2018

Publicato on-line: 03.05.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.028

troponine cardiache, sia nei protocolli di valutazione e confronto delle caratteristiche dei vari metodi, che sono già disponibili in Italia o lo saranno tra pochi mesi. I dati riportati in questo documento prendono in considerazione solo le evidenze sperimentali che sono state ottenute utilizzando protocolli sperimentali internazionali standardizzati.

INTRODUZIONE

Specifiche di qualità dei metodi di misura delle troponine cardiache

Nell'anno 2000, le linee guida hanno stabilito per la prima volta che cTnI e cTnT dovevano essere considerate come i biomarcatori di elezione per la diagnosi di infarto acuto del miocardio (IMA) (1). Queste linee guida hanno indicato che la concentrazione di cTnI e cTnT corrispondente al 99° percentile della popolazione di riferimento doveva essere considerata come il valore soglia per la diagnosi di IMA (1). Inoltre, le stesse linee guida hanno definito che tale valore decisionale doveva essere misurato con un errore, espresso come coefficiente di variazione (CV), uguale o inferiore al 10% (1). Negli anni successivi, tutte le linee guida nazionali e internazionali hanno sempre confermato queste raccomandazioni, ribadendo i concetti e le definizioni in esse contenute (2-9).

E' evidente che queste specifiche di qualità di fatto assumono che siano presenti nel circolo sanguigno quantità misurabili di cTnI e cTnT, anche nei soggetti sani. Tale evidenza è stata però verificata sperimentalmente solo dopo l'anno 2004 (10-13), quando sono stati messi a punto e resi disponibili per i laboratori clinici, i primi sistemi immunometrici per piattaforme automatizzate con sensibilità analitica ≤ 10 ng/L, che sono stati appunto in grado di misurare le concentrazioni di cTnI e cTnT nella maggior parte dei soggetti in apparente buona salute, comprese le donne adulte e i soggetti in età pediatrica, che generalmente presentano livelli circolanti molto bassi del biomarcatore (14-22).

Dal punto di vista metodologico, è importante rilevare come la messa a punto di metodi che misurino il 99° percentile della popolazione di riferimento (URL) con un errore $\leq 10\%$ sia una sfida molto difficile da vincere, in quanto tale valore può essere stimato entro l'intervallo 15-50 ng/L per la cTnI (Tabella 1) e mediamente di 14 ng/L per la cTnT, considerando i metodi ad alta sensibilità, attualmente disponibili in Italia (11-21).

Utilizzando miocardiociti di ratto, ovini e umani, Marjot J et al. (23) hanno recentemente dimostrato che il valore di URL corrisponde al contenuto di cTnI o cTnT presente in ~ 40 mg di tessuto miocardico, confermando una stima teorica che era stata precedentemente suggerita da altri autori (12). I risultati degli studi più recenti suggeriscono che sono necessarie sensibilità analitiche di ~ 1 ng/L (e forse anche meno) da parte dei metodi immunometrici per raggiungere l'obiettivo ottimale di misurare la concentrazione del biomarcatore con valori superiori al limite di rilevabilità ("limit of detection", LoD) del metodo utilizzato, nel 99% della popolazione generale in apparente buona salute, inclusa l'età pediatrica (12, 13, 18-22). Da un punto di vista clinico, è importante rilevare come la sensibilità analitica dei metodi immunometrici attualmente disponibili per la misura delle troponine cardiache, sia notevolmente superiore al grado di discriminazione e risoluzione spaziale anche delle più recenti tecniche di imaging del tessuto miocardico (24).

Attualmente, sono pochi i sistemi immunometrici, applicati a piattaforme automatizzate, che sono in grado di soddisfare le specifiche di qualità raccomandate dalle linee guida. In accordo con Apple FS et al. (21), è necessario prendere in considerazione due criteri per stabilire se un metodo immunometrico può essere definito ad alta sensibilità analitica (termine derivato dalla definizione in lingua inglese "high sensitivity"). Il primo criterio, che è una *conditio sine qua non*, stabilisce che si definiscono esami di laboratorio ad alta sensibilità analitica per la misura di cTnI e cTnT esclusivamente i metodi immunometrici che sono in grado di misurare l'URL con un errore uguale o inferiore al 10%, come raccomandato da tutte le linee guida nazionali e internazionali. Il secondo criterio stabilisce che i metodi ad alta sensibilità per cTnI e cTnT sono anche in grado di misurare i livelli circolanti delle troponine cardiache con valori superiori al LoD del metodo nella maggioranza dei soggetti adulti in apparente buona salute.

In questo documento verrà utilizzato sempre il termine ad alta sensibilità, che è più simile al termine inglese "high sensitivity", per indicare i metodi per la misura di cTnI e cTnT che soddisfano entrambi i criteri richiesti dalle specifiche di qualità delle linee guida (3, 6-9). Sebbene il termine italiano elevata sensibilità possa essere accettabile dal punto di vista lessicale, sarebbe opportuno che tutti i professionisti di medicina di laboratorio utilizzassero un unico e comune termine per indicare i metodi "high sensitivity", che sono i metodi, e soltanto quelli, che soddisfano entrambi i criteri richiesti dalle

Tabella 1

99° percentile della popolazione di riferimento di tre metodi per la misura della troponina I

	Metodo ARCHITECT	Metodo Access hs	Metodo ADVIA Centaur hs
Popolazione generale ng/L	26,2	17,5 (12,6-20,7)	47,34 (36,39-64,27)
Femmine ng/L	15,6	11,6 (8,4-18,3)	36,99 (30,22-72,63)
Maschi ng/L	34,2	19,8 (14,0-42,9)	57,27 (38,58-90,15)
Numero di soggetti arruolati	1531	1098	2010

I valori riportati sono quelli suggeriti dalle aziende produttrici. Tra parentesi sono riportati i limiti di confidenza al 95%.

specifiche di qualità delle più recenti linee guida (21).

I metodi ad alta sensibilità di più recente introduzione sono in grado di misurare i livelli circolanti di cTnI in una percentuale di soggetti normali (inclusa la popolazione pediatrica) significativamente più elevata (18, 19), rispetto ai metodi precedentemente immessi in commercio che misuravano la concentrazione di cTnI (14) o cTnT (15, 16, 25) in ~50-75% della popolazione adulta (20-65 anni) in apparente buona salute. Alcuni autori hanno proposto una classificazione in 4 livelli di sensibilità in dipendenza dalla percentuale di soggetti sani che sono misurabili con i vari metodi (26). Il recentissimo documento della "Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers" di IFCC (27) raccomanda, invece, che il secondo criterio dovrebbe essere diversamente formulato in modo da distinguere la popolazione in relazione al sesso. In accordo con questa formulazione, il secondo criterio prevede che un metodo per cTnI e cTnT ad alta sensibilità debba misurare concentrazioni del biomarcatore superiori al valore di LoD in più del 50% sia in una popolazione di riferimento costituita da soli maschi che in una costituita da sole femmine (27).

In accordo con le più recenti linee guida internazionali (3, 7, 9, 21) i metodi che misurano il 99° percentile della popolazione di riferimento con un errore inferiore al 20% (ma maggiore del 10%) si possono ancora utilizzare nella pratica clinica, ma non si devono definire ad alta sensibilità analitica. I metodi che invece misurano l'URL con un errore maggiore del 20% non dovrebbero più essere utilizzati per la diagnosi di IMA (3, 7). In quest'ultima categoria rientrano quasi tutti i metodi di Point Of Care Testing (POCT), che possono essere utilizzati per un primo screening a letto del paziente, in ambulanza o nei centri di pronto soccorso periferici che non dispongono di un laboratorio clinico. Questi metodi sono pertanto utilizzabili per evidenziare i pazienti ad alto rischio di IMA, allo scopo di avviarli il più velocemente possibile direttamente a un reparto clinico

specializzato in grado di effettuare con urgenza un intervento coronarico invasivo, come raccomandato dalle più recenti linee guida internazionali (9).

Stato dell'arte dei metodi ad alta sensibilità per le troponine cardiache

Attualmente, sono pochi i sistemi immunometrici per cTnI, distribuiti in Italia, che sono in grado di soddisfare entrambi i criteri per essere considerati metodi ad alta sensibilità. Nella Tabella 2 sono riportati i parametri di sensibilità analitica dei metodi per la misura di cTnI e cTnT che sono stati introdotti in Italia in questi ultimi anni (18, 19, 25, 28-30). Come si può notare, la caratteristica principale di questi metodi è quella di presentare valori di sensibilità analitica (espressi in termini di LoD) <10 ng/L. Altro dato essenziale è che il rapporto tra il valore di URL e il valore della concentrazione di troponina, misurata con un errore uguale al 10% (10% del limite di quantificazione; LoQ), deve essere ≥ 1 . È importante rilevare come alcuni recenti metodi per la misura di cTnI presentino valori di questo rapporto tra 4 e 6 (Tabella 2), indicando che il valore decisionale è misurato con errore molto inferiore al 10% (18, 19, 28).

Come esempio, sono riportati in Figura 1 i profili di imprecisione dei metodi per la misura di cTnI con le piattaforme ARCHITECT (Figura 1A) e Access Dxl (Figura 1B) valutati nello stesso laboratorio, utilizzando un protocollo sperimentale accurato e standardizzato (19, 28). Considerando i valori del 99° percentile suggeriti dalle aziende produttrici rispettivamente per il metodo ARCHITECT (26,2 ng/L) e Access (17,5 ng/L) (Tabella 1), queste concentrazioni sono entrambe misurate con un errore di ~5%, cioè la metà del valore di imprecisione richiesto dalle linee guida. Per il metodo ARCHITECT sono disponibili alcuni studi che hanno valutato la distribuzione dei valori di cTnI, misurati con questo metodo in una ampia popolazione sia di soggetti

Tabella 2

Confronto dei parametri di sensibilità analitica dei metodi immunometrici più comuni in Italia per la misura delle troponine I e T, che utilizzano piattaforme automatizzate

Metodo	LoB (ng/L)	LoD (ng/L)	LoQ 20% CV (ng/L)	LoQ 10%CV (ng/L)	Rapporto*	Riferimento
cTnI						
ARCHITECT	0,7	1,3	1,8	4,7	5	(19)
Vidas	0-1,9	1,3-3,2	2,9-4,9	13,1	1,5	Dati forniti dal produttore
Access Dxl	0,6	1,3	2,1	5,3	4	(27)
ADVIA	1,0	2,2	3,5	8,4	5	(29)
AIA	1,1	2,1	15,0	30,9	1	(28)
cTnT						
ECLIA	3	3-5	6	13	1,3	(25)

I valori dei parametri di sensibilità analitica sono stati valutati nello stesso laboratorio utilizzando protocolli standardizzati, mentre i dati che riguardano il metodo che utilizza la piattaforma Vidas sono stati forniti dal produttore.

**Rapporto tra il valore del 99° percentile della popolazione di riferimento suggerito dall'azienda e il valore LoQ 10% CV.*

LoB, limite del bianco; LoD, limite di rilevabilità; LoQ, limite di quantificazione; LoQ 20% CV, valore misurato con un CV >10% e <20%; LoQ 10% CV, valore misurato con un CV <10%.

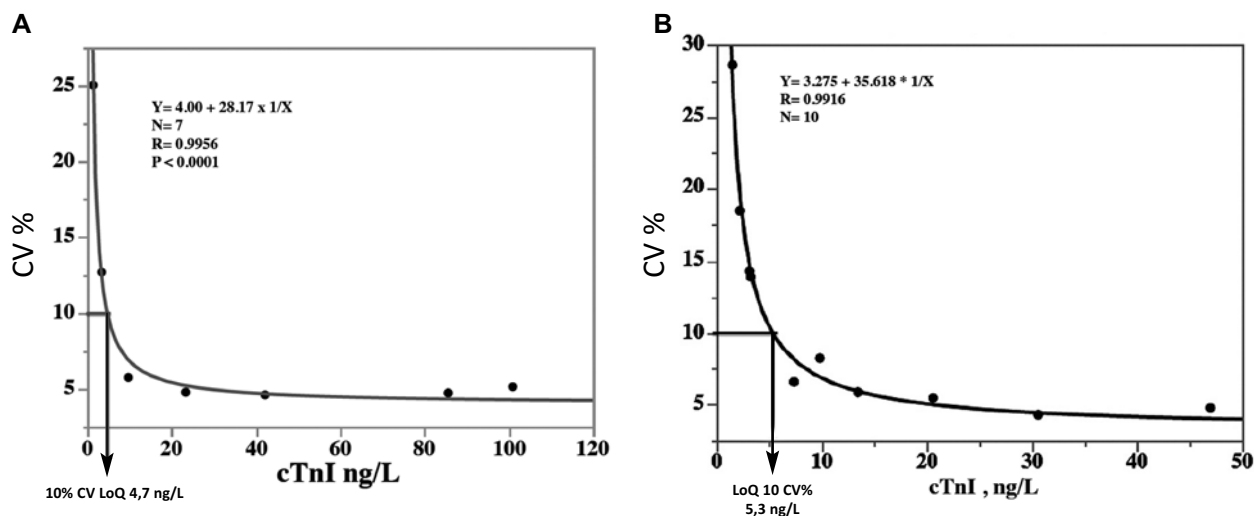


Figura 1

Pannello A: profilo di imprecisione del metodo per il dosaggio della cTnI su ARCHITECT i1000SR (STAT Architect high-sensitivity TnI method, Abbott Diagnostics, Ref. B3P250). Per il calcolo del profilo di imprecisione sono stati utilizzati 7 pool di plasma di soggetti normali e di pazienti cardiopatici che sono stati misurati 40 volte nell'arco di almeno 60 giorni lavorativi con tre differenti lotti di reagenti e calibratori. **Pannello B:** profilo di imprecisione del metodo per il dosaggio della cTnI su piattaforma DXi 800 (Access hsTnI (IUO), REF B52699, Beckman Coulter, Inc. Brea, CA 92821 USA). Per il calcolo del profilo di imprecisione sono stati utilizzati 10 pool di plasma di soggetti normali e di pazienti cardiopatici che sono stati misurati 40 volte nell'arco di almeno 60 giorni lavorativi con due differenti lotti di reagenti e calibratori.

adulti (22) che in età pediatrica (19). Questi dati dimostrano che il metodo ARCHITECT è in grado di misurare concentrazioni di cTnI maggiori del LoD rispettivamente in più del 90% della popolazione adulta e in più del 85% della popolazione in età pediatrica in apparente buona salute (19, 22). Purtroppo, attualmente, vi sono pochi dati sulla distribuzione delle concentrazioni del biomarcatore misurate su ampie popolazioni di individui apparentemente sani con la maggior parte dei metodi per cTnI distribuiti in Italia (28-30). Per questo motivo, non vi sono ancora sufficienti evidenze sperimentali per definire ad alta-sensibilità questi metodi più recenti (20-22).

In questi ultimi anni si può certamente affermare come vi sia stato un miglioramento costante e progressivo delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura di cTnI e cTnT, come pure una riduzione delle differenze sistematiche tra le misurazioni. Infatti, in uno studio del gruppo di lavoro IFCC, pubblicato nel 2004 (10), nessun metodo allora in commercio o in corso di studio riusciva a soddisfare le specifiche di qualità raccomandate dalle linee guida internazionali e, inoltre, vi era una differenza fino a 20 volte tra i valori decisionali riportati per i differenti metodi di cTnI e cTnT. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato come persistano ancora sia differenze sistematiche tra i valori misurati di cTnI, che nelle caratteristiche analitiche tra i metodi di misura di cTnI e cTnT (13, 20-22, 26, 31). I valori riportati in Tabella 1 evidenziano come sia tuttora presente una differenza tra i valori del 99° percentile della popolazione di riferimento dei diversi metodi fino a circa due volte.

Risulta, quindi, opportuno discutere in dettaglio le problematiche e le difficoltà metodologiche che

riguardano la valutazione accurata sia dei parametri di sensibilità analitica, che il calcolo dell'URL.

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI SENSIBILITÀ ANALITICA: DALLA TEORIA ALLA PRATICA

Bianco del metodo e stima del parametro limite del bianco

I fondamenti teorici su cui si basa la valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura sono discussi in dettaglio nel documento dell'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) del 1995 (32). In particolare, questo documento specifica che il valore determinato dal segnale chimico-analitico (LoD) deve essere distinto dal rumore di fondo. Questi fondamenti teorici sono stati poi recepiti da tutti i documenti e protocolli successivi (33-35) e discussi in dettaglio da molti Autori (36-39).

Considerando il caso particolare di un metodo immunometrico che utilizza una piattaforma automatizzata, il rumore di fondo può essere assimilato al concetto di bianco del metodo, che corrisponde al valore che è misurato dal sistema in un campione in cui non è presente l'analita (32, 34, 36). La Figura 2 illustra il significato statistico-matematico dei parametri di sensibilità correntemente denominati LoB e LoD ("limit of blank" e "limit of detection" della lingua inglese) in accordo con i documenti ISO e IUPAC (32, 33). In particolare, la Figura 2 mostra come il valore critico (LC) possa essere considerato una valida stima del valore di LoB, cioè del bianco del metodo. Il valore di LoB, infatti, corrisponde alla concentrazione dell'analita che può

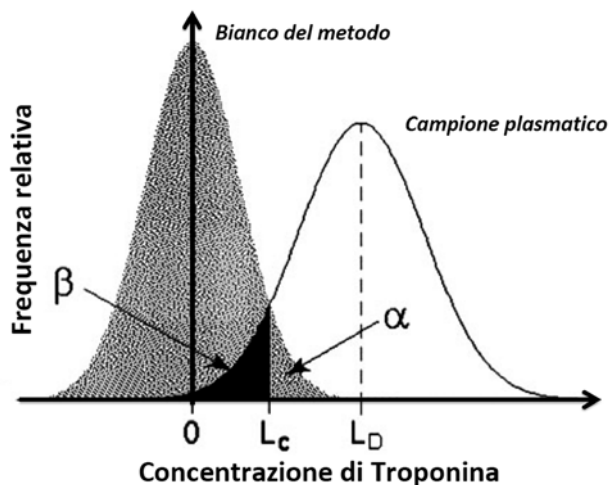


Figura 2

Relazione teorica tra il valore del bianco (LoB) e quello del limite di rilevabilità (LoD) secondo la definizione IUPAC e ISO (32, 33). Il livello critico (LC) è il valore di LoB, che corrisponde al 95° percentile della distribuzione dei valori del bianco misurati dal metodo. Il valore di rilevabilità (LD) corrisponde al valore di LoD, che è calcolato con la formula: $LoB + 1,645 DS$. Solo se le deviazioni standard delle distribuzioni dei valori misurati del bianco del metodo e del campione plasmatico con concentrazione nulla di troponina sono uguali, LC corrisponde contemporaneamente al 95° percentile della distribuzione dei valori misurati del bianco del metodo (area punteggiata, alfa) e al 5° percentile della distribuzione dei valori misurati nel campione plasmatico (area colorata in nero, beta) (39). Se, l'assunzione di omoschedasticità non è soddisfatta, come generalmente avviene nella pratica, LoB non risulta uguale ma soltanto si approssima al 5° percentile della distribuzione dei valori misurati nel campione plasmatico.

essere distinta con una probabilità uguale a α (Figura 2) dal valore 0 (bianco del metodo). Generalmente la probabilità viene scelta con un valore di $P=0,05$. Considerando il caso particolare dei metodi per la misura delle troponine cardiache, il parametro di sensibilità LoB può essere quindi definito (ipotesi nulla) come la più elevata apparente concentrazione di troponina cardiaca che non può essere distinta dalla concentrazione 0 (32, 34, 36). In pratica, il calcolo del valore LoB di un metodo immunometrico per la misura delle troponine cardiache si ottiene dalla formula seguente

$LoB (ng/L) = \text{valore medio del bianco del metodo (ng/L)} + 1DS$ della distribuzione dei valori del bianco del metodo moltiplicato per 1.645 (deviata standardizzata corrispondente a un probabilità di 0,05 in una direzione) (34, 36).

Sfortunatamente, non è sempre semplice scegliere nella pratica corrente, quando si utilizzano sistemi immunometrici applicati su piattaforme automatizzate, il campione più adatto da utilizzare come bianco del metodo per determinare il valore LoB. Quando l'azienda produttrice mette a disposizione i materiali per la calibrazione del sistema immunometrico, includendo il calibratore 0 (che presenta appunto una concentrazione dell'analita uguale a 0), questo può essere considerato come bianco del metodo. Purtroppo, è però sempre più frequente da parte delle aziende produttrici la pratica di non fornire agli utilizzatori gli standard necessari per la calibrazione del metodo immunometrico. Tuttavia, vi è comunque sempre la possibilità di una valutazione della curva di calibrazione che il sistema utilizza per calcolare i valori di cTnI e cTnT nei campioni clinici.

Come esempio, nella Figura 3A è rappresentata la

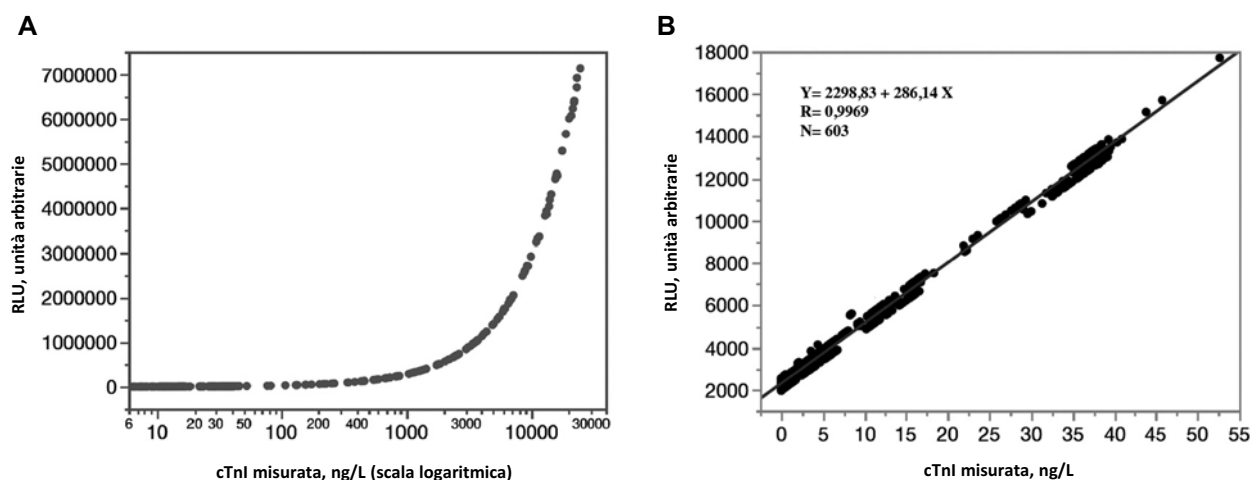


Figura 3

Pannello A: relazione non lineare tra la concentrazione misurata di cTnI e il segnale chemiluminescente (espresso come Relative Luminescence Units, RLU,) per il metodo ADVIA Centaur TNIH su Centaur XPT (Siemens Healthineers Diagnostics). Sono rappresentati in figura i risultati della misura di 734 campioni di plasma di soggetti normali e di pazienti con malattie cardiovascolari, inclusi alcuni con infarto del miocardio, ottenuti nell'arco di circa tre mesi utilizzando due differenti lotti di materiali e calibratori. Pannello B: relazione lineare tra la concentrazione misurata di cTnI (asse delle ascisse) e il segnale chemiluminescente (espresso come RLU, asse delle ordinate) per il metodo ADVIA Centaur TNIH su Centaur XPT (Siemens Healthineers Diagnostics), prendendo in considerazione 603 campioni di soggetti normali e di pazienti cardiopatici con valori di cTnI inferiori a 60 ng/L. Utilizzando i parametri di questa regressione lineare si può stimare il valore di LoB del metodo come descritto in dettaglio nel testo.

relazione tra i valori misurati di cTnI (sull'asse delle ascisse, in ng/L), che coprono l'intero arco delle concentrazioni misurabili dell'analita, e i relativi valori del segnale dello strumento (sull'asse delle ordinate, come "Relative Luminescence Units", RLU), che sono parametri sempre disponibili come dati nel programma dei sistemi immunometrici che utilizzano le più comuni piattaforme automatizzate. La regressione, riportata nella Figura 3A, è stata ottenuta misurando molti campioni di soggetti normali e pazienti con malattie cardiache nell'arco di 60 giornate lavorative utilizzando più lotti di materiali e di calibratori. La regressione rappresenta, quindi, una valida stima della curva di calibrazione media utilizzata dal metodo immunometrico per calcolare i valori di cTnI nei campioni, nell'arco di tempo considerato. In particolare, si può prendere in considerazione la parte della curva di calibrazione che corrisponde a valori di campioni con basse concentrazioni di cTnI (ad esempio tra 0 e 50 ng/L) (Figura 3B). Questa relazione tra i valori di cTnI misurati (in ascisse) e i valori di RLU (in ordinata) risulta lineare e fornisce una stima realistica del valore medio del bianco del metodo (come RLU, stimato dalla intercetta sull'asse delle ordinate della retta). In questo caso, si potrà verificare, misurando più volte tale calibratore 0 nell'arco di più giorni lavorativi (Figura 4), che il valore medio trovato, espresso in RLU, sarà non significativamente differente dal valore di RLU stimato con la retta di regressione riportata in Figura 3B.

Purtroppo, non è sempre possibile per l'utilizzatore avere a disposizione un calibratore 0, che funga da bianco del metodo, e quindi, in pratica, si utilizza un campione che abbia un valore, espresso in RLU, simile a quello stimato dalla regressione riportata nella Figura 3B. In questo caso, possono fungere come valido sostituto del bianco del metodo una soluzione tampone, meglio se corretta con l'aggiunta di albumina bovina in concentrazione simile a quella proteica del plasma umano (preparata *ad hoc* in laboratorio), la soluzione eluente o di lavaggio del sistema immunometrico fornita dalla azienda produttrice, oppure campioni plasmatici di soggetti con valori molto bassi del biomarcatore.

Nell'esempio sopra considerato, si può osservare come il valore medio misurato del bianco del metodo (calibratore 0), espresso in RLU (media=2299,99; DS=174,62; N=72) (Figura 4) è, di fatto, non significativamente differente dal valore 0 di cTnI stimato dalla regressione lineare riportata nella Figura 3B (in media 2298,83 RLU) e mostra anche una distribuzione assimilabile a una curva normale, come richiesto dalla teoria (32, 33). Considerando la regressione lineare riportata in Figura 3B, è possibile calcolare i valori di concentrazione (in ng/L) corrispondenti a 72 misure del calibratore 0 (media=0,004 ng/L, DS=0,6102) e, di seguito, anche il valore LoB del metodo considerato con la formula sopra riportata: $\text{LoB (ng/L)} = \text{media bianco del metodo (ng/L)} + \text{DS bianco del metodo (0,6102 ng/L)} \times 1,645 = 0 + 0,61 \times 1,645 = 1,00 \text{ (ng/L)}$.

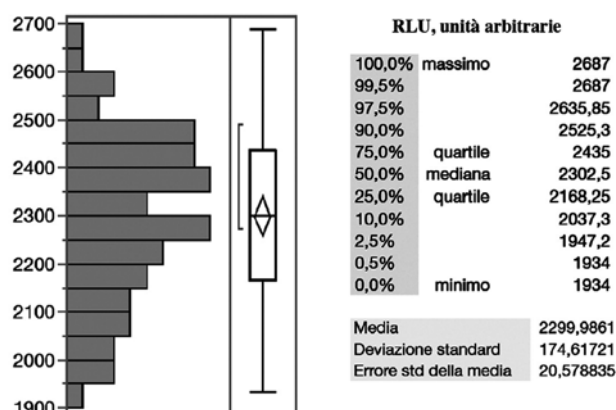


Figura 4

Distribuzione dei valori (espressi come RLU) del calibratore 0 del metodo ADVIA Centaur TNIH applicato su Centaur XPT. Questo calibratore (considerato come bianco del metodo) è stato misurato in 72 differenti sessioni in un arco di tempo di più di 60 giorni lavorativi utilizzando due differenti lotti di reagenti e calibratori.

Stima del parametro LoD

Il valore LoD è generalmente definito come la più piccola concentrazione di troponina cardiaca che può essere realmente distinta dal valore LoB (32-38) (Figura 2). In pratica, il valore LoD può essere calcolato come segue:

$$\text{LoD (ng/L)} = \text{LoB (ng/L)} + \text{DS} \times 1,645$$

dove DS indica la deviazione standard di un campione, misurato più volte, di un soggetto con valore di troponina molto vicino al valore LoB (34, 36) (Figura 2). Considerando l'esempio precedente, dopo aver misurato un campione di un soggetto con un valore di cTnI molto basso (media 0,51 ng/L, DS 0,70, N=45), il valore LoD risulta: $\text{LoB (1,0 ng/L)} + (1,645 \times 0,70) = 1,0 + 1,15 = 2,15 \text{ ng/L}$.

È interessante osservare che se il valore stimato del bianco del metodo è uguale o molto vicino a 0 e i valori delle deviazioni standard del bianco del metodo e del campione sono uguali (come assunto dalla teoria) (32, 38), il parametro LoD risulta esattamente uguale a 3,29 ($2 \times 1,645$) volte il valore di DS del parametro LoB. In accordo con questa osservazione, il valore calcolato come LoD ha una probabilità uguale a 0,001 di non essere diverso dal valore del bianco del metodo (assunto uguale a 0 ng/L di troponina). Questa osservazione spiega anche perché generalmente il parametro LoD risulta molto simile a due volte il parametro LoB.

È importante sottolineare che la relazione tra LoB e LoD, come riportato nella Figura 2, richiede che le DS delle distribuzioni dei valori di troponina misurate rispettivamente nel bianco del metodo e nel campione plasmatico siano uguali (condizione di omoschedasticità) (32, 38). Infatti, solo se questa assunzione è soddisfatta, si può dimostrare che il valore

critico (L_C , parametro LoB) rappresenta contemporaneamente sia il limite inferiore dell'errore del I tipo (falsi positivi, area α della Figura 2), che il limite superiore dell'errore del II tipo (falsi negativi, area β nella Figura 2) (31). In particolare, il primo test (calcolo del valore di LoB) ha come ipotesi nulla che la troponina non è presente nel bianco del metodo, mentre il secondo (calcolo del valore di LoD) che la troponina non è presente a una certa concentrazione (valore del bianco del metodo) in un campione con bassi valori del biomarcatore (39). Si può, quindi, incorrere nell'errore di tipo I, se si misura un valore di troponina significativamente diverso da 0 (cioè $>L_C$), quando l'analita è assente (falso positivo), oppure, rispettivamente, nell'errore di tipo II, se si misura un valore non significativamente differente da 0 (cioè $<L_C$), quando la troponina è presente nel campione (falso negativo) (Figura 2) (32). Purtroppo questa fondamentale condizione di omoschedasticità risulta del tutto arbitraria, perché di fatto non è mai soddisfatta in pratica (38).

Un'altra osservazione, molto rilevante dal punto di vista della pratica clinica, è che il valore LoD di un metodo immunometrico per le troponine cardiache (in ng/L), ha 999 probabilità su 1000 ($p=0,001$) di essere considerato differente dal valore LoB (assunto uguale a 0 ng/L). Se invece, il valore di LoD è utilizzato nella pratica clinica come limite inferiore dell'intervallo di misura del metodo di dosaggio, in accordo con la sua definizione di LoD , ha solamente 50 probabilità su 100 ($p=0,50$) di essere considerato un valore misurabile (37). Questa osservazione sembra però in contrasto con alcuni recenti risultati che hanno indicato che anche valori di troponina compresi tra i valori LoB e LoD di un metodo immunometrico possono presentare un rilevante significato clinico (soprattutto prognostico), suggerendo che sono necessari ulteriori approfondimenti sulle considerazioni teoriche che riguardano la definizione di LoB e LoD (40-45).

CONSEGUENZE PRATICHE DELLE ASSUNZIONI TEORICHE RELATIVE ALLA DEFINIZIONE DI SENSIBILITA' ANALITICA

Molto si è discusso, anche recentemente, tra gli esperti del settore, sulle assunzioni teoriche che la definizione IUPAC/ISO sulla nomenclatura relativa alla valutazione delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura (32, 33) richiede e sulle loro possibili conseguenze pratiche, in particolare quando queste definizioni si applicano ai metodi ad alta sensibilità per la misura delle troponine cardiache (37, 40, 41, 43, 44). Risulta, infatti, evidente che per stabilire se un metodo è ad alta sensibilità si deve trovare un consenso tra gli esperti su una definizione e una procedura analitica, entrambe rigorose, che permettano di stabilire senza ambiguità se i sistemi immunometrici effettivamente posseggono queste specifiche di qualità. Inoltre, sembra anche ragionevole supporre che i metodi definiti

ad alta sensibilità, siano caratterizzati non solo da migliori caratteristiche analitiche, ma anche da una migliore accuratezza diagnostica e prognostica nella pratica clinica (27). Infatti, la scelta di utilizzare nella pratica clinica metodi che sono più costosi e anche di più difficile interpretazione clinica, come lo sono certamente i metodi definiti ad alta sensibilità rispetto a quelli della precedente generazione, è considerata accettabile solo se i nuovi metodi sono in grado di presentare un bilancio positivo tra costi e benefici (46). In particolare, i metodi immunometrici ad alta sensibilità per cTnI e cTnT, per avere un buon rapporto costo/beneficio, dovrebbero consentire di effettuare più rapidamente e/o in modo più accurato, diagnosi e prognosi in pazienti con sospetto di malattie cardiovascolari.

Una preliminare e generale considerazione deve essere tenuta ben presente prima di affrontare e confrontare l'utilità dei vari parametri di sensibilità analitica nella classificazione dei metodi ad alta sensibilità per la misura di cTnI e cTnT. Deve essere ricordato che si ha comunque sempre una perdita di informazione significativa e quindi un costo da pagare, quando una variabile continua (come la misura delle cTnI e cTnT) viene utilizzata in test statistici per la diagnosi o la prognosi come una variabile dicotomica, utilizzando un valore decisionale (44, 47). Ad esempio è ben noto che l'utilizzo della mediana della distribuzione dei valori della variabile continua, comporta in alcuni test statistici non solo la perdita di una rilevante parte di informazione dei dati (e quindi di perdita di potenza statistica), ma anche, dal punto di vista clinico, un possibile aumento dei falsi positivi, come pure una sottostima degli eventi in una analisi di regressione tra gruppi (47). Analogamente, l'utilizzo di un limite decisionale, corrispondente ai valori di LoB , LoD o LoQ , è sicuramente una semplificazione necessaria in alcuni contesti clinici, ma comporta delle limitazioni rilevanti, che i laboratoristi e i clinici dovrebbero conoscere e tenere ben presenti quando questi parametri vengono utilizzati negli algoritmi diagnostici e prognostici.

Altre limitazioni sono inerenti alla teoria stessa della definizione di sensibilità analitica del documento IUPAC del 1995 (32). La Figura 2 rappresenta schematicamente la relazione che esiste tra i valori di LoB e LoD in accordo con la definizione IUPAC/ISO (32, 33). Nella figura è riportato il caso particolare in cui la concentrazione media dei valori di troponina, misurata nel campione che costituisce il bianco del metodo sia uguale a 0 ng/L. Il valore, indicato come L_C corrisponde quindi al valore di LoB , mentre il valore indicato come L_D , corrisponde al valore di LoD . Purtroppo, nella pratica del laboratorio clinico è improbabile che le DS dei valori del bianco del metodo e del campione di soggetti con bassa concentrazione di troponina siano uguali, in quanto il bianco del metodo mostra una concentrazione media minore di quella dei campioni di soggetti normali. È ben noto che vi è una regressione lineare positiva tra i valori delle concentrazioni misurate dell'analita e i rispettivi valori di DS (37, 48). Ad esempio, in Figura 5

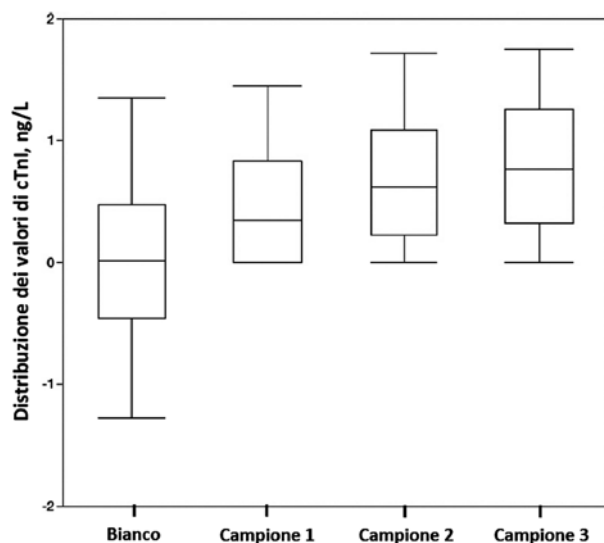


Figura 5

Distribuzione dei valori (box plot) di cTnI misurati con il metodo ADVIA Centaur TNIH che utilizza la piattaforma Centaur XPT, del calibratore 0 (bianco del metodo) e di tre campioni di plasma di soggetti normali con concentrazioni del biomarcatore inferiori a 2 ng/L.

sono riportate rispettivamente le distribuzioni dei valori di cTnI del bianco e di quella di 3 campioni plasmatici di soggetti normali con valori molto bassi dell'analita che però presentano valori di DS tutti significativamente più elevati ($p < 0,0001$) rispetto a quelli del bianco del metodo (media campione 1: 0,51 ng/L, DS: 0,70; media campione 2: 0,69 ng/L, DS: 0,59; media campione 3: 0,82 ng/L, DS: 0,59; N=45). Non essendo quasi mai soddisfatta l'assunzione che il bianco del metodo e il campione plasmatico abbiano valori di varianza uguali (condizione detta di omoschedasticità), come richiesto dalla definizione IUPAC/ISO (32, 38, 39), non esiste un solo valore critico LC (Figura 2) che rappresenti nello stesso tempo il 95° percentile della distribuzione dei valori del bianco del metodo e il 5° percentile della distribuzione dei valori del campione plasmatico. I due percentili hanno bensì valori distinti, e quindi non sono più valide le assunzioni teoriche alla base della definizione IUPAC/ISO (32, 38, 39). Per questo motivo, si cerca di utilizzare per la valutazione del parametro LoD un campione che abbia una varianza dei valori misurati di troponina molto simile a quella del bianco del metodo, come nell'esempio considerato.

Date queste limitazioni teoriche e le difficoltà sperimentali osservate nella valutazione dei valori di LoB, alcune linee guida hanno suggerito di utilizzare anche i valori di LoQ per stimare più accuratamente le caratteristiche analitiche dei metodi immunometrici per la misura di cTnI e cTnT (20, 21, 49). Tuttavia, l'utilizzo del valore LoQ presenta a sua volta sia limitazioni teoriche che criticità a livello sperimentale, che meritano una discussione più approfondita (22, 45).

VALUTAZIONE DEL LIMITE DI QUANTIFICAZIONE COME PARAMETRO DI SENSIBILITÀ ANALITICA

L'utilizzo del valore LoQ (espresso come CV al 20%) per stimare la sensibilità analitica, deriva storicamente dagli studi del gruppo di Spencer CA et al. (50) sull'importanza clinica delle caratteristiche analitiche dei metodi immunometrici di dosaggio della tirotropina. Questi Autori hanno suggerito per primi di definire sensibilità funzionale il valore LoQ al 20% CV, appunto per porre l'accento sulla capacità di questo parametro di legare insieme la riproducibilità e la sensibilità analitica del metodo con l'interpretazione clinica del risultato in pazienti con malattie tiroidee (50).

Nel 2017 la Food and Drug Administration statunitense (FDA) (51) ha approvato il metodo per la misura della cTnT (Elecsys Troponin T Gen 5 STAT, Roche Diagnostics) per la diagnosi di IMA suggerendo come limite inferiore dell'intervallo di misura il valore LoQ al 20% CV (6 ng/L), piuttosto che il parametro LoD (3-5 ng/L) (Tabella 2), come invece raccomandato dal documento EP17-A (32) del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) e dalle più recenti linee guida sull'utilizzo dei metodi di misura di cTnI e cTnT per la diagnosi della sindrome coronarica acuta (27, 52).

Come evidenziato dai dati riportati in Tabella 2, il parametro LoQ al 20% CV presenta generalmente un valore di concentrazione di troponina maggiore del parametro LoD. Inoltre, il parametro LoQ presenta un CV molto minore rispetto ai valori di LoD e LoB in quanto l'errore analitico (asse delle ordinate) aumenta esponenzialmente tendendo all'infinito, quando il valore di cTnI tende a 0 (asse delle ascisse) (Figura 1 e Figura 2).

Se si prendono in considerazione i parametri di sensibilità analitica del metodo ECLIA per la cTnT (Tabella 2) si nota che il valore LoQ al 10% CV (13 ng/L) è simile all'URL (14 ng/L), mentre il valore LoQ al 20% CV (6 ng/L) è molto vicino ai valori del parametro LoD (valori compresi tra 3 e 5 ng/L a seconda della tipologia del metodo). Per contro, i metodi per la misura della cTnI mostrano risultati non omogenei. Tuttavia, i metodi immunometrici con le caratteristiche analitiche migliori (come ARCHITECT, Access DxI e ADVIA) mostrano valori del parametro LoQ 20% CV, valutati nel medesimo laboratorio con gli stessi protocolli standardizzati, molto più vicini al LoD (con una differenza di ~1-2 ng/L) che al valore del parametro LoQ 10% CV (differenza >3 ng/L). Inoltre, questi metodi presentano valori più elevati del rapporto tra il valore dell'URL e il valore del parametro LoQ 10% CV, indicando che questi metodi misurano il valore decisionale per la diagnosi di IMA con una imprecisione eccellente (compresa tra il 4% e il 6%, cioè circa la metà di quella richiesta dalle linee guida internazionali). Considerando quindi i dati riportati nella Tabella 2, la scelta di utilizzare un limite inferiore

dell'intervallo di lavoro uguale al parametro LoQ 20%CV (come suggerito dalla FDA per il metodo ad alta sensibilità per cTnT) piuttosto che il parametro LoD, come suggerito dal protocollo CLSI EP17-A (34) e da alcune recenti linee guida (27, 52) potrebbe sembrare accettabile per il metodo ECLIA per la cTnT, ma forse meno opportuno per i metodi per cTnl, che presentano le migliori caratteristiche analitiche.

Un indubbio vantaggio di utilizzare il parametro LoQ 20% CV è che l'errore analitico per la misura di questo valore risulta di fatto uguale per tutti i metodi, mentre il valore di LoD mostra una variabilità più elevata (generalmente $\geq 30\%$ CV), con un errore di misura che per alcuni metodi, con caratteristiche analitiche inferiori, risulta molto elevato. Inoltre, come abbiamo discusso nei precedenti paragrafi, il calcolo dei valori di LoB e di LoD presenta delle limitazioni teoriche, come pure notevoli difficoltà sperimentali. Per contro, la definizione del profilo di imprecisione non presenta limitazioni teoriche e l'approccio sperimentale può essere standardizzato (34, 50). Di conseguenza, bisogna valutare per ciascun metodo, usando protocolli sperimentali designati *ad hoc* e test statistici specifici e di potenza adeguata, quale sia il più valido indice da utilizzare come limite inferiore dell'intervallo di lavoro tra il valore di LoD o LoQ 20% CV.

Dal punto di vista clinico, recenti evidenze hanno dimostrato che il rischio cardiovascolare aumenta progressivamente con la concentrazione di troponina (specialmente se misurata con metodi ad alta sensibilità), anche per valori compresi nell'intervallo di concentrazioni di troponina dei soggetti apparentemente sani e che, quindi, presentano livelli circolanti del biomarcatore al di sotto dell'URL (53-63). Questi dati suggeriscono che nei metodi di dosaggio delle troponine ad alta sensibilità, conviene utilizzare un limite inferiore dell'intervallo di misura al livello più basso possibile, quindi il parametro LoD (se non addirittura LoB) invece del LoQ 20% CV. Tuttavia sono necessari studi clinici designati *ad hoc* per dimostrare questa ipotesi.

DOVE SIAMO E DOVE POSSIAMO ANDARE

E' prevedibile che il cammino teso al miglioramento delle caratteristiche analitiche dei metodi di misura di cTnl e cTnT proseguirà anche nei prossimi anni fino a raggiungere per la maggior parte dei sistemi immunometrici, il traguardo di misurare i livelli circolanti del biomarcatore in praticamente tutti i soggetti sani, comprese le donne e individui in età pediatrica, con valori al di sopra del limite di rilevazione del metodo (12, 21, 22, 26).

In particolare, confrontando le caratteristiche analitiche dei metodi di misura di cTnl e cTnT dal 2004 (10) fino ai tempi più recenti (21, 28-31) (Tabella 2) si nota come si sia notevolmente ridotta la differenza tra il valore del parametro LoQ 10 % CV, che è l'errore richiesto dalle linee guida per misurare l'URL, e i rispettivi valori dei parametri LoB o LoD. Come discusso in dettaglio in un recente documento della Sezione Italiana dell'European Ligand Assay Society (ELAS)

(64), la sensibilità analitica di un metodo immunometrico non dipende solo dal sistema di rilevazione del segnale analitico, ma anche dalle proprietà della relazione che si instaura tra il legando (nel caso specifico la cTnl o cTnT) presente nel campione da misurare e il sistema legante del metodo. Infatti, man mano che la concentrazione dell'analita del campione diminuisce, le interferenze (sia specifiche che aspecifiche) tendono a perturbare con una forza progressivamente crescente il legame specifico tra l'analita e il sistema legante, diminuendo così la capacità del sistema immunometrico di discriminare tra la vera concentrazione dell'analita e il rumore di fondo (64). Questo fenomeno è particolarmente importante per quegli analiti che sono presenti nel plasma umano in concentrazione di ng/L (o inferiori), come cTnl e cTnT. E' importante sottolineare che questo effetto è tipico di tutti i metodi di misura che utilizzano un sistema legante per determinare l'analita e quindi non si dovrebbe verificare nei metodi di misura che utilizzano tecniche analitiche differenti, come ad esempio i metodi di misura basati sulla spettrometria di massa. Purtroppo, almeno al momento, non esistono metodi di misura alternativi ai metodi immunometrici, utilizzabili nel laboratorio clinico, per cTnl e cTnT.

Il già citato documento della "Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers" di IFCC (27) suggerisce la necessità che i laboratori clinici, valutino tutti i parametri di sensibilità analitica (cioè: LoB, LoD e LoQ). Questo documento (27) raccomanda, quindi, che le aziende produttrici dei materiali per il controllo di qualità mettano a disposizione di tutti i laboratori dei campioni di controllo che siano commutabili con i campioni di soggetti sani e di pazienti con malattie cardiovascolari, e che presentino concentrazioni di cTnl e cTnT nell'intervallo riscontrato nei soggetti normali, comprese concentrazioni molto basse, in modo da poter valutare accuratamente i valori di LoB e LoD. Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che è possibile preparare campioni di controllo commutabili con i campioni di soggetti normali e di pazienti cardiopatici con valori molto bassi di cTnl e cTnT (31). I risultati di nostri studi ancora più recenti, che riguardano il confronto tra i metodi di misura di cTnl recentemente introdotti in commercio in Italia (19, 28-30), dimostrano che è possibile preparare dei pool di plasma di soggetti normali con concentrazioni molto basse di cTnl e cTnT, che possono essere quindi utilizzati per valutare accuratamente il profilo di imprecisione e i valori dei parametri LoB e LoD.

CONCLUSIONI

Fin dall'anno 2000 la misura di cTnl e cTnT è stata raccomandata come la strategia di scelta per la diagnosi differenziale di IMA da tutte le linee guida nazionali e internazionali (1-9). Numerose evidenze sperimentali, che si sono accumulate in questi ultimi anni, dimostrano come progressivi incrementi di cTnl e cTnT, anche nell'intervallo di concentrazioni del biomarcatore considerate normali, sono significativamente associati a

un aumento sia di eventi cardiovascolari avversi che di mortalità (27, 49, 65).

Questi risultati sperimentali non si sarebbero potuti produrre senza l'utilizzo di metodi di misura per cTnl e cTnT che presentano caratteristiche tipiche di metodi ad alta-sensibilità. Tuttavia, l'utilizzo di questi metodi ha evidenziato come molti aspetti della degradazione intracitoplasmatica, del rilascio dal miocardiocita e del turnover periferico di cTnl e cTnT, sia nei soggetti normali (a riposo come pure durante sforzo fisico intenso) che nei pazienti con cardiomiopatie, non siano ancora ben noti (65).

Da un punto di vista fisiopatologico, la misura di cTnl e cTnT non può dimostrare la causa dell'aumentato rilascio del biomarcatore dal miocardiocita, cioè se questo sia dovuto a danno reversibile, ad apoptosi oppure a necrosi del miocardiocita. D'altra parte, l'elevata sensibilità analitica degli attuali metodi di misura di cTnl e cTnT è superiore al potere discriminante delle più recenti e sofisticate tecniche di imaging applicate al sistema cardiovascolare (12, 23, 65). Per questo motivo tutte le linee guida più recenti sottolineano come sia necessaria da parte dei clinici un'attenta valutazione di tutti i casi in cui vi sia un aumento progressivo delle concentrazioni circolanti di cTnl e cTnT, anche quando si riscontri all'anamnesi un'apparente assenza di condizioni cliniche responsabili del danno (27, 49, 65).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined: a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-95.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for universal definition of myocardial infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1581-98.
- Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:552-74.
- Apple FS, Jesse RL, Newby LK, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007;53:547-51.
- Thygesen K, Mair J, Katus H, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010;31:2197-204.
- Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33:2252-7.
- Casagrandi I, Cavazza M, Clerico A, et al. Proposal for the use in emergency departments of cardiac troponins measured with the latest generation methods in patients with suspected ACS without persistent ST-segment elevation. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1727-37.
- 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.
- Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, et al. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50:327-32.
- Clerico A, Fortunato A, Ripoli A, et al. Distribution of plasma cardiac troponin I values in healthy subjects: pathophysiological considerations. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:804-8.
- Giannoni A, Giovannini S, Clerico A. Measurement of circulating concentrations of cardiac troponin I and T in healthy subjects: a tool for monitoring myocardial tissue renewal? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1167-77.
- Apple FS, Ler R, Murakami MM. Determination of 19 cardiac troponin I and T assay 99th percentile values from a common presumably healthy population. *Clin Chem* 2012;58:1574-81.
- Prontera C, Fortunato A, Storti S, et al. Evaluation of analytical performance of the Siemens ADVIA Tnl Ultra Immunoassay. *Clin Chem* 2007;53:1722-3.
- Jarausch J, Braun S, Dolci A, et al. Evaluation of a development version of the Elecsys highly sensitive troponin T assay. *Clin Chem* 2008;54(Suppl. 6):A91.
- Saenger AK, Beyrau R, Braun S, et al. Multicentre analytical evaluation of a high-sensitive troponin T assay. *Clin Chim Acta* 2011; 412:748-54.
- Venge P, James S, Jansson L, et al. Clinical performance of two highly sensitive cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 2009;55:109-16.
- Krintus M, Kozinski M, Boudry P, et al. European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT highly sensitive troponin I immunoassay. *Clin. Chem Lab Med* 2014;52:1657-65.
- Caselli C, Cangemi G, Masotti S, et al. Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a highly sensitive immunoassay method: highly sensitive troponin I in pediatric age. *Clin Chim Acta* 2016;458:68-71.
- Sandoval Y, Apple FS. The global need to define normality: the 99th percentile value of cardiac troponin. *Clin Chem* 2014;60:455-62.
- Apple FS, Collinson PO. IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem* 2012;58:54-61.
- Clerico A, Zaninotto M, Ripoli A, et al. The 99th percentile of reference population for cTnl and cTnT assay: methodology, pathophysiology and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1634-51.
- Marjot J, Kaier TE, Martin ED, et al. Quantifying the release of biomarkers of myocardial necrosis from cardiac myocytes and intact myocardium. *Clin Chem* 2017;63:990-6.
- Barison A, Grigoratos C, Todiere G, et al. Myocardial interstitial remodelling in non-ischaemic dilated cardiomyopathy: insights from cardiovascular magnetic

- resonance. *Heart Fail Rev* 2015;20:731-49.
25. Franzini M, Lorenzoni V, Masotti S, et al. The calculation of the cardiac troponin T 99th percentile of the reference population is affected by age, gender, and population selection: a multicenter study in Italy. *Clin Chim Acta* 2015;438:376-81.
 26. Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: It's time to keep a scorecard. *Clin Chem* 2009;55:1303-6.
 27. Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2018;64:645-55.
 28. Masotti S, Prontera C, Musetti V, et al. Evaluation of analytical performance of a new high-sensitivity immunoassay for cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:492-501.
 29. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for cTnI using the automated AIA-CL2400 platform. *Clin Chem Lab Med* 2018. doi: 10.1515/cclm-2017-1101.
 30. Masotti S, Musetti V, Prontera C, et al. Evaluation of analytical performance of a new ADVIA immunoassay using the Centaur XPT platform system for the measurement of cardiac troponin I. *Clin Chem Lab Med* 2018. doi: 10.1515/cclm-2017-0387.
 31. Clerico A, Ripoli A, Masotti S, et al. Pilot study on harmonization of cardiac troponin I immunoassays using patients and quality control plasma samples. On behalf of the Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS) and of the Study Group on Cardiovascular Biomarkers of the Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBioC). *Clin Chim Acta* 2016;456:42-48.
 32. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantitation capabilities. *Pure Appl Chem* 1995;67:1699-723.
 33. ISO 11843-1:1997, Capability of detection – Part 1: Terms and definitions. <https://www.iso.org/standard/1096.html> (ultimo accesso: Marzo 2018).
 34. Clinical Laboratory Standards Institute. CLSI document EP17-A. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation. Approved guidelines. 2004. <http://demo.nextlab.ir/getattachment/98997564-97ae-4a9f-b03f-0f5deea6e523/CLSI-EP17-A.aspx> (ultimo accesso: Marzo 2018)
 35. Clinical Laboratory Standard Institute. CLSI EP21 protocol. Evaluation of total analytical error for quantitative medical laboratory measurement procedure. 2nd ed, July 2016. Wayne, Pennsylvania, 2016.
 36. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl i):S49-S52.
 37. Ungerer JPJ, Pretorius CJ. High-sensitivity cardiac troponin: do think twice, it's not all right. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1669-71.
 38. Thompson M, Ellison SLR. Towards an uncertainty paradigm of detection capability. *Anal Methods* 2013;5:5857.
 39. Faber MN. The limit of detection is not the analyte level for deciding between "detected" and "not detected". *Accred Qual Assur* 2008;13:227-8.
 40. Pretorius CJ, Ungerer PJ. Improved diagnostic performance of high-sensitivity cardiac troponin assays is an artifact of censored data. *Clin Chem* 2016;55:1654-7.
 41. Boeckel JN, Palapies L, Zeller T, et al. Estimation of values below the limit of detection of a contemporary sensitive troponin I assay improves diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2015;61:1197-206.
 42. Parikh RH, Seliger SL, de Lemos J, et al. Prognostic significance of high-sensitivity cardiac troponin T concentrations between the limit of blank and limit of detection in community-dwelling adults: a meta-analysis. *Clin Chem* 2015;61:1524-31.
 43. Lackner K. High-sensitivity assays for cardiac troponins – continued. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1631-5.
 44. Jarolim P. Terminology of cardiac troponin assays and data censoring. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1672-4.
 45. Greene DN, Tate JR. Establishing consensus-based, assay-specific 99th percentile upper reference limits to facilitate proper utilization of cardiac troponin measurements. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1675-82.
 46. Price CP, Christenson RH. Adopting the principles of Evidence-Based Laboratory Medicine in routine practice. In: Price CP, Christenson RH, eds. *Evidence-Based Laboratory Medicine. From principles to outcomes*. Washington DC: AACC Press, 2003: 247-63.
 47. Altman DG, Royston P. The cost of dichotomizing continuous variables. *Br Med J* 2006;332:1080.
 48. Ellison SLR, Ramsey MH, Lawrence P, et al. Is measurement uncertainty from sampling related to analyte concentration? *Anal Methods* 2017;9:9589-96.
 49. Apple FS, Sandoval Y, Jaffe AS, et al.; IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. Cardiac troponin assays: guide to understanding analytical characteristics and their impact on clinical care. *Clin Chem* 2017;63:73-81.
 50. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. *Clin Chem* 1996;42:140-5.
 51. FDA review memorandum. 510(k) Substantial Equivalence Determination Decision Summary Assay only Template; 510(k) Number: K162895. www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/k162895.pdf (ultimo accesso: Marzo 2018)
 52. Apple FS, Jaffe AS, Collinson P, et al. on behalf of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem* 2015;48:201-3.
 53. Eggers KM, Jaffe AS, Lind L, et al. Value of cardiac troponin I cut-off concentrations below the 99th percentile for clinical decision-making. *Clin Chem* 2009;55:85-92.
 54. Sinning C, Keller T, Zeller T, et al. Association of high-sensitivity assayed troponin I with cardiovascular phenotypes in the general population: the population-based Gutenberg health study. *Clin Res Cardiol* 2014;103:211-22.
 55. Giannitsis E, Katus HA. Off limits: highly sensitive troponin in the general population. *Eur Heart J* 2016;3737:2438-40.
 56. de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA* 2010;304:2503-12.
 57. Saunders JT, Nambi V, de Lemos JA, et al. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the ARIC Study. *Circulation* 2011;123:1367-76.
 58. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2012;126:1596-604.
 59. Hussein AA, Gottdiener JS, Bartz TM, et al.

- Cardiomyocyte Injury Assessed by a Highly Sensitive troponin assay and sudden cardiac death in the community: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2112-20.
60. Blankenberg S, Salomaa V, Makarova N, et al. Troponin I and cardiovascular risk prediction in the general population: the BiomarCaRE consortium. *Eur Heart J* 2016;37:2428-37.
61. de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA* 2010;304:2503-12.
62. Everett BM, Zeller T, Glynn RJ, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and B-type natriuretic peptide as predictors of vascular events in primary prevention: impact of statin therapy. *Circulation* 2015;131:1851-60.
63. Van Der Linden N, Klinkenberg LJJ, Bekers O, et al. Prognostic value of basal high-sensitive cardiac troponin levels on mortality in the general population. *Medicine* 2016;95:e5703.
64. Clerico A, Belloni L, Carrozza C, et al. A Black Swan in clinical laboratory practice: the analytical error due to interferences in immunoassay methods. *Clin Chem Lab Med* 2017; doi:/10.1515/cclm-2017-0881.
65. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018; doi: 10.1177/2048872617748553.

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

Elisa Piva¹, Fiamma Balboni², Giuseppe Banfi³, Graziella Bonetti⁴, Massimo Daves⁵, Alberto Dolci⁶, Davide Farci Santarcangeli⁷, Gabriel Lima-Oliveira⁸, Giuseppe Lippi⁸, Massimo Locatelli⁹, Valentino Miconi¹⁰, Martina Montagnana⁸, Margherita Morandini¹¹, Paola Pezzati¹², Massimo Quercioli¹², Riccardo Tartaglia¹³, Gian Luca Salvagno⁸, Giulio Toccafondi¹³, Davide Giavarina¹⁴ per Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIPMeL "Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio", Gruppo di Studio SIBioC "Rischio clinico" e per Società Italiana di Ergonomia e fattori umani (SIE)

¹UOC di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova, Italia

²Laboratorio Analisi Istituto Fiorentino Cura e Assistenza IFCA, Firenze

³IRCCS Galeazzi e Università Vita e Salute San Raffaele, Milano

⁴UO Laboratorio Centrale di Analisi Chimico Cliniche, ASST-Spedali Civili, Brescia

⁵Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Merano

⁶Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", Milano

⁷Servizio di Medicina di Laboratorio IRCCS MultiMedica, Milano

⁸Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università degli Studi di Verona

⁹Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale San Raffaele, Milano

¹⁰Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Arzignano, Arzignano, VI

¹¹Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli, Pordenone

¹²Struttura Organizzativa Dipartimentale "Sicurezza e Qualità in Laboratorio" AOU-Careggi, FI

¹³Centro Gestione Rischio Clinico e Sicurezza del Paziente della Regione Toscana

¹⁴Laboratori Analisi AULSS n 8 Berica, Vicenza, Italia

ABSTRACT

Recommendations for the detection and management of critical results in clinical laboratories. Critical results (also known as panic or alarm results) identify a laboratory test result associated with a serious risk for the patient's health, requiring immediate communication to the physician to establish appropriate therapeutic interventions. The adoption of an efficient procedure for the communication of critical values/results is crucial for clinical, ethical, organizational reasons, because it is a requirement for laboratory accreditation and because of potential legal consequences related to the lack of notification of harmful laboratory results. In 2008, the Italian Society of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine (SIBioC) published its first consensus-based recommendation for the detection and management of critical values in clinical laboratories, with the aim to improve the implementation of standardized and universally accepted procedures, promoting an essential policy toward rational and efficient solutions to this issue. These new recommendations represent a complete review of the first document. Using the same consensus conference method between experts of scientific societies, the main aspects of clinical risk, patient safety and legal liability of health care workers were re-considered. The SIBioC and the Italian Society of Laboratory Medicine (SIPMeL), Intersociety Study Group on Standardization of extra-analytical variability of laboratory results, together with the Italian Society of Ergonomics and Human Factors (SIE) collaboration, issued the present joint document.

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

Ricevuto: 26.01.2018

Accettato: 01.02.2018

Publicato on-line: 02.03.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.015

INTRODUZIONE

Nell'approccio centrato sul paziente, la medicina di laboratorio svolge un ruolo integrante nell'ambito del processo decisionale clinico, poiché i risultati degli esami di laboratorio forniscono informazioni insostituibili per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie. Nella gestione del paziente e nelle decisioni cliniche l'utilizzo di un risultato di laboratorio diventa particolarmente cruciale quando il risultato stesso rispecchia una situazione di rischio per la vita del paziente. Originariamente definito da George Lundberg come valore critico o di panico, il concetto di risultato critico si applica quindi a quei risultati che sottendono un rischio immediato per la vita del paziente e che richiedono un tempestivo intervento terapeutico correttivo (1). I risultati critici devono essere distinti dagli esami critici. Questi ultimi generano esiti critici per qualsiasi risultato, indipendentemente dal suo valore, e necessitano di una tempestiva disponibilità del dato poiché esso ha effetti immediati sul processo decisionale clinico, anche nel caso in cui non sia associato a un rischio per la salute del paziente (ad esempio la comunicazione del risultato della determinazione delle troponine cardio-specifiche per "rule-in" o "rule-out" rapidi di una sindrome coronarica acuta). Il medico che prescrive un esame critico si assume la responsabilità di verificare la disponibilità del risultato in tempi clinicamente utili per la corretta gestione del paziente, mentre il laboratorio deve contestualmente garantire un tempo di risposta appropriato. Non esiste una lista consensuale universalmente accettata di esami critici, perché gli stessi sono strettamente legati alla complessità e alla tipologia di situazioni cliniche trattate nella struttura sanitaria di appartenenza del laboratorio. La definizione di risultati di rischio significativo, per il paziente, può essere invece applicata a risultati non attesi, che non rappresentano un rischio immediato per la vita del paziente ma che, se non comunicati in tempi clinicamente appropriati, possono potenzialmente determinare esiti avversi. Anche per questa categoria di risultati non esiste una lista definita consensualmente, in quanto strettamente legati al quesito/sospetto diagnostico formulato e alla tipologia del paziente (ad esempio paziente ambulatoriale o ricoverato) (2, 3).

Sulla base del tradizionale confronto trasversale, il valore critico è definito come tale quando supera un livello decisionale, definito in accordo all'evidenza e all'esperienza clinica (4). Il confronto longitudinale, possibile quando siano disponibili dati precedenti dello stesso paziente, può basarsi sulla differenza critica ["reference change value" (RCV)] intesa come

$$RCV = 2^{1/2} * Z * (CV_i^2 + CV_a^2)^{1/2}$$

dove CV_i indica il CV biologico intraindividuale e CV_a il CV analitico fra giorni in un processo analitico stabile (5,6), e Z il numero di deviazioni standard che corrispondono a una desiderata probabilità (per $p < 0,05$ $Z=1,96$) (7). La differenza critica può avere un ruolo per stabilire la non criticità del valore, indipendentemente dal significato attribuibile al solo risultato numerico, qualora

valori precedenti, molto vicini temporalmente, siano già noti e sottendano una stazionarietà clinica, seppur grave, ma non inattesa. Al contrario, risultati all'interno dell'intervallo di riferimento possono costituire criticità per una variazione significativa intercorsa entro un termine temporale che ne definisce la gravità clinica. L'ambito temporale entro cui considerare clinicamente significative le variazioni per i parametri selezionati può essere anch'esso dedotto dalla letteratura scientifica, utilizzando ad esempio i dati di Oosterhuis et al. (8). A titolo esemplificativo, un dimezzamento della conta piastrinica (emivita delle piastrine 5-7 giorni) può essere considerato critico se osservato entro poche ore dal risultato precedente, ma non è necessariamente da considerarsi tale se osservato a distanza di settimane o mesi (9).

Un risultato critico o uno a rischio significativo, possono essere entrambi al di fuori del relativo intervallo di riferimento o comunque molto diversi dal risultato precedente e come tali possono essere in relazione a molteplici eventi, prima fra tutti una condizione patologica del paziente (10-15). Tuttavia, essi possono derivare da altre potenziali cause, non necessariamente riconducibili alla situazione clinica del paziente. Innanzitutto, è necessario escludere che il risultato sia causato da un errore, eventualità non remota, scaturito nell'ambito della globalità del processo laboratoristico, dalla raccolta del campione biologico alla refertazione (16). Per garantire la reale accuratezza del risultato devono sussistere procedure preventive di esclusione di potenziali errori dell'attività di laboratorio in fase pre- e intra-analitica. In particolare, l'identificazione del paziente, l'idoneità del campione biologico e l'accuratezza della determinazione devono essere valutate a priori. Al fine di escludere cause non cliniche, devono essere note le principali caratteristiche della tecnica analitica, le sostanze potenzialmente interferenti e l'accuratezza della metodica. In questo contesto di "Total Quality Management", è imperativo che il risultato sia tempestivamente disponibile al clinico, il quale deve intraprendere le azioni necessarie per evitare esiti clinici infausti. In presenza di questi risultati, deve essere quindi prevista una comunicazione tempestiva al medico che ha in cura il paziente, al fine di evitare ritardi nella gestione terapeutica. Lo sviluppo di una politica di comunicazione dei risultati critici è a tutti gli effetti una procedura del sistema qualità della medicina di laboratorio. Molti laboratori hanno implementato sistemi per la notifica dei risultati critici, giacché è responsabilità del laboratorio effettuare l'identificazione dei risultati da considerare critici o a rischio significativo, la loro gestione e la loro comunicazione, monitorando le modalità operative in atto per la ricezione da parte del clinico.

La notifica dei risultati critici rappresenta quindi un importante momento di contatto tra clinica e laboratorio, finalizzato a garantire la sicurezza del paziente.

PRESUPPOSTI CLINICI, ETICI E MEDICO-LEGALI

Dall'originaria definizione di Lundberg, il concetto di risultato critico non è sostanzialmente mutato, mentre è

cambiato radicalmente l'approccio dei servizi sanitari e della stessa medicina di laboratorio nel processo di gestione di questo particolare aspetto. Pertanto, uno dei compiti più importanti dell'attività post-analitica è rappresentato dalla notifica dei risultati critici, diventata una procedura del sistema qualità del laboratorio, i cui requisiti sono inseriti in molte norme di accreditamento. La necessità in termini clinici di notificare immediatamente i risultati critici è chiaramente deducibile dal fatto che questo comporta un sostanziale cambiamento della gestione clinica del paziente in oltre il 65% dei casi (17, 18).

L'opportunità di identificare e comunicare risultati critici idonei e condivisi per gli esami di laboratorio è oggi universalmente riconosciuta in molti Paesi (19). Negli Stati Uniti, già dal 2005, con l'obiettivo di migliorare la sicurezza del paziente, la Joint Commission (JC) ha pubblicato un programma di accreditamento dei laboratori in cui la comunicazione dei risultati critici è un obiettivo nazionale di sicurezza dei pazienti (National Patient Safety Goals, NPSGs). Nello specifico requisito (NPSG.02.03.01, tuttora in vigore) i risultati critici devono essere riportati in maniera tempestiva e gli elementi di valutazione del processo sono ben descritti (20). A livello internazionale, lo standard di Accreditamento ISO 15189:2012, il più accettato per i laboratori clinici, definisce specificamente la necessità per il laboratorio di avere una politica per la gestione dei risultati critici e stabilisce che *"il laboratorio deve garantire che i risultati critici, dove applicabile, siano comunicati in modo efficace per soddisfare le esigenze degli utenti"* (21). Contestualmente alle normative di numerosi standard di accreditamento, sono state promosse anche iniziative di armonizzazione. Ciò in considerazione delle sostanziali differenze evidenziate in letteratura nel processo di notifica e concernenti l'uso di diversa terminologia, scelta di differenti limiti critici, differenza nelle politiche di comunicazione e gestione dei processi. L'attenzione suscitata da queste iniziative ha evidenziato che inefficacia o mancanza della comunicazione stessa dovrebbero essere annoverate tra gli errori di laboratorio, che possono causare un evento avverso, data la condizione di rischio del paziente evidenziabile dalla criticità del risultato. Negli Stati Uniti, il College of American Pathologists (CAP) ha identificato nella comunicazione dei risultati critici un requisito essenziale per ottenere e mantenere l'accreditamento della struttura (22), mentre la gestione dei valori/resultati critici è inclusa nell'ambito di una specifica legge federale, mutuata dalle indicazioni Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA '88), che vincola tutti i "Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS)", cioè i laboratori accreditati dal sistema sanitario statunitense, a istituire procedure idonee per la gestione di questo specifico problema (23).

In Italia, il Dlgs 229/99 ha stabilito che l'accreditamento istituzionale sia rilasciato dalle regioni alle strutture autorizzate, pubbliche o private e ai professionisti che ne facciano richiesta, in subordine alla loro rispondenza ai requisiti ulteriori di qualificazione,

alla loro funzionalità rispetto agli indirizzi di programmazione regionale e alla verifica positiva dell'attività svolta e dei risultati raggiunti. Il modello per l'accreditamento istituzionale delle strutture di Medicina di Laboratorio, formulato nel giugno 2015 dall'Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali (AGENAS), al requisito 2.2.3, prevede la disponibilità di una procedura per la trasmissione tempestiva dell'esito in caso di valori/resultati critici predefiniti, al soggetto che ha richiesto gli esami (24).

In ogni caso, oltre alle normative di accreditamento o a considerazioni cliniche, la necessità di definire procedure idonee per la tempestiva comunicazione dei risultati critici deve considerare anche norme giurisprudenziali attualmente vigenti. La scienza medico-legale, in particolare, affronta lo studio della colpa medica in ambito diagnostico in termini di omissione, errore differenziale, ma anche ritardo. Si stabilisce infatti che *"la colpa di sanitari che abbiano aggravato le conseguenze di una precedente lesione non interrompe il nesso di causalità, a meno che una causa sopravvenuta sia tale da determinare in via esclusiva l'evento dannoso"*. Ai sensi dell'art. 42 del Codice Penale, sussiste il reato di omissione se è dimostrata una cosciente volontà (dolo) di rifiutare un intervento riconosciuto necessario, che deve cioè essere compiuto senza ritardo per ragioni di salute (secondo l'art. 328 del Codice Penale). Sempre in termini giurisprudenziali, questa premessa ha ispirato una sentenza della pretura di Ivrea, secondo cui *"il sanitario che omette di rilevare un risultato diagnostico sospetto e di comunicare con tempestività il riscontro risponde del reato di lesioni colpose, in quanto ha ommesso indebitamente di prevenire l'aggravarsi di un patologia"* (25). Infine, va rammentato che secondo una sentenza della Cassazione (4400/04), l'ente ospedaliero è responsabile dei danni causati ai pazienti da comportamenti colposi dei propri sanitari, anche quando questi consistano non nel mancato risultato dell'intervento sanitario, ma nella semplice perdita di chances derivante da omissione o ritardo di diagnosi.

In stretta connessione al contenzioso in materia di responsabilità medica è la tematica del rischio clinico. La legge dell'8 marzo 2017, n. 24 "Disposizioni in materia di sicurezza delle cure e della persona assistita, nonché in materia di responsabilità professionale degli esercenti le professioni sanitarie" individua l'area del rischio clinico non solo nelle attività cliniche ma, in senso lato, in quelle sanitarie ovvero relative alla salute e sanità nel suo complesso, includendo non solo gli aspetti clinico-assistenziali, ma anche quelli tecnologico-ambientali-organizzativi e correlati all'appropriatezza e sostenibilità delle cure.

L'appropriatezza clinica e organizzativa dell'assistenza, e i principi di gestione del rischio clinico sono diventati parte integrante dell'attività istituzionale dei laboratori clinici e si devono applicare anche per prevenire gli eventuali eventi avversi legati ai risultati critici. Questa rilevante tematica si colloca pienamente nell'ambito della qualità e della valutazione degli esiti.

A prescindere dalle considerazioni di cui sopra, la corretta gestione delle criticità dei risultati rappresenta una misura importante per dimostrare l'efficacia del laboratorio, poiché essa ne riflette l'efficienza diagnostica e gestionale, con pesanti ricadute sugli esiti clinici ed economici della struttura. I risultati critici sono stati pertanto inseriti quale importante aspetto della qualità extra-analitica, il cui monitoraggio e valutazione deve essere condotto utilizzando indicatori specifici di performance (26-29). Nondimeno, affinché il processo d'implementazione dei risultati critici nei laboratori clinici possa dirsi concretamente efficace e funzionale, è necessario comprendere che le variabili in grado di influenzare l'efficienza del sistema sono molteplici.

STATO DELL'ARTE

Malgrado il concetto di risultato critico sia oggi universalmente riconosciuto quale standard essenziale nella buona pratica di laboratorio, la sua applicazione è molto eterogenea. Da numerosi sondaggi, condotti anche con diversa temporalità nella stessa nazione, il livello di adempimento ai requisiti di organizzazioni come JC o CAP negli Stati Uniti dimostrava una considerevole eterogeneità, suggerendo di definire obiettivi di miglioramento (30). Nonostante gli standard internazionali di accreditamento richiedano che i laboratori clinici implementino sistemi per la comunicazione tempestiva e affidabile di risultati critici, le evidenze degli studi e dei sondaggi pubblicati hanno dimostrato l'esistenza di pratiche difformi, l'impiego di terminologie eterogenee e di livelli decisionali molto differenti, sia a livello nazionale, sia internazionale (31-35). Queste variazioni nell'approccio operativo al problema richiedono di essere armonizzate onde poter fornire un servizio più sicuro. Recenti pubblicazioni evidenziano le principali aree nelle quali l'armonizzazione delle procedure di notifica dei valori/risultati critici è possibile, se non necessaria, offrendo un approccio metodologico per la progettazione di sistemi più idonei ed efficaci per una comunicazione tempestiva e sicura (36-39). Per quanto concerne la situazione sul territorio nazionale, in un sondaggio condotto nel 2007 al quale hanno risposto 107 laboratori italiani, solo il 55% degli intervistati riteneva utile la segnalazione di valori critici. Solo il 20% dei laboratori aveva procedure codificate per la gestione e meno del 50% prevedeva un sistema di archiviazione (peraltro molto eterogeneo, quando presente) della notifica. Per quanto concerne la presa in carico della comunicazione di risultati critici di pazienti ricoverati, nel 76,7% dei casi essa coinvolgeva direttamente il personale medico, nel 14,6% il personale sanitario non medico e nel 7,8% dei

casi il dato era notificato alla prima figura professionale raggiungibile in reparto (40). In altro studio del 2009, su un totale di 90 laboratori partecipanti, l'82,2% risultava accreditato o certificato ma le procedure scritte per la notifica dei risultati critici erano presenti nel 72,2% dei partecipanti e solo il 56% aggiornava e revisionava regolarmente le proprie procedure. Sebbene il 90% dei partecipanti avesse stabilito il tempo di notifica, solo il 57,8% ne effettuava registrazione consentendone la tracciabilità. Il 62,2% dichiarava una procedura di "read-back" per la gestione della comunicazione, mentre il 36,7% era adempiente alle Raccomandazioni SIBioC e SIPMeL (Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio). Tra i laboratori, la comparazione dei limiti e dell'elenco dei risultati critici dimostrava grande variabilità e scarsa armonizzazione, specie per alcuni parametri, rispecchiando quanto si può evincere dalla letteratura (41).

DEFINIZIONE DI UNA LISTA DI LIMITI E RISULTATI CRITICI

I principali problemi nella stesura di procedure idonee alla definizione di una lista di risultati critici sono legati all'esiguità degli studi sugli esiti clinici che consentano di determinare la scelta del limite da considerare critico e l'entità di variazione che possa essere considerata realmente critica. In letteratura sono disponibili liste di risultati critici i cui limiti sono stati sviluppati con il consenso e l'esperienza congiunta di clinici e professionisti della medicina di laboratorio (Tabelle 1-3)*. Altre liste di riferimento sono state rese disponibili dai sondaggi volontari promossi dal CAP Statunitense e da altri sondaggi condotti in Australia, Asia, Europa, Italia compresa.

Il Laboratorio deve adottare dei criteri basati sulle evidenze scientifiche più recenti per comporre la lista dei risultati critici da proporre in una successiva fase strutturata di condivisione, di cui si fa garante la struttura aziendale deputata alla gestione del rischio clinico e di cui è responsabile il Dipartimento di medicina di laboratorio. Alla fase di condivisione partecipano il personale dei reparti per il settore ospedaliero, i medici di medicina generale e i pediatri di libera scelta per le cure territoriali, intermedie e di continuità. L'obiettivo della fase di condivisione è l'approvazione di una lista di risultati critici e risultati di rischio significativo da comunicare secondo specifica procedura. L'identificazione dei risultati critici avviene esclusivamente in base alle esigenze della propria realtà, e si basa, ad esempio sulla specificità delle Unità Operative o su altri fattori come il genere o l'età. Ad esempio, un valore di 6,8 mmol/L di potassio può non essere critico per pazienti ricoverati presso una Unità

*Le informazioni contenute nelle Tabelle da 1 a 3 sono da considerare come punto di partenza per la costruzione dell'elenco di risultati critici di un laboratorio e non come una rigorosa linea guida applicabile a tutti gli scenari clinici.

Le Tabelle comprendono una lista di risultati critici della letteratura citata nei riferimenti. I valori sono riportati in unità SI e in unità tradizionali. Le Tabelle non comprendono tutti i risultati che possono essere considerati critici quali, ad esempio, la tossicologia e il monitoraggio terapeutico dei farmaci. Inoltre queste Tabelle non prendono in considerazione i risultati di rischio significativo, ossia quegli esami che non rappresentano un rischio immediato per la vita del paziente ma che, se non comunicati in tempi clinicamente appropriati, possono potenzialmente determinare esiti avversi.

Tabella 1*Costituenti biologici e rispettivi limiti critici*

Esame	Unità	IFCC ⁴⁵		ASCP 46 ⁴⁶		RCP ⁴⁷	
		Limite inferiore	Limite superiore	Limite inferiore	Limite superiore	Limite inferiore	Limite superiore
<i>Ematologia</i>							
Leucociti	10 ⁹ /L	<2	>50	<2	>40	—	—
Neutrofilii	10 ⁹ /L	<0,5	—	—	—	<0,5	>50
Emoglobina	g/L	<66	>199	<70	>200	<50 ^a <70 ^c	>190 ^b
Piastrine	10 ⁹ /L	<20	>1000	<40	>1000	<30	—
<i>Coagulazione</i>							
PT	sec	—	—	—	>30	—	—
INR		—	—	—	>5	—	>6,50 (pz. in TAO)
APTT (sec)	sec	—	75	—	>80	—	—
Fibrinogeno	g/L	<0,8	—	<0,9	>8	—	—
<i>Chimica clinica</i>							
Glucosio	mmol/L	<2,5	>27,8	<2,5	>25	<2,5	>25
	mg/dL	<45	>500	<45	>450	—	—
Potassio	mmol/L	<2,8	>6,2	<2,8	>6,2	<2,5	>6,5
Sodio	mmol/L	<120	>160	<120	>160	<120	>150
Calcio Totale	mmol/L	<1,65	>3,5	<1,6	>3,3	<1,8	>3,5
	mg/dl	<6,6	>14,0	<6,5	>13	—	—
Calcio Ionizzato	mmol/L	<0,78	>1,6	<0,8	>1,6	—	—
	mg/dl	<3,1	>6,3	<3,2	>6,2	—	—
Magnesio	mmol/L	<0,41	>5	—	—	<0,4	—
	mg/dl	<1,0	>4,9	—	—	—	—
Fosfato	mmol/L	<0,32	>2,9	<0,3	>2,9	<0,3	—
	mg/dl	<1,0	>9,0	<1,0	>9,0	—	—
Osmolalità	mOsm/kg	<240	>330	<250	>325	—	—
pH		<7,2	>7,6	<7,2	>7,6	—	—

a: anemia microcitica o macrocitica; b: anemia normocitica suggestiva di emorragia o insufficienza midollare; c: oppure ematocrito >55 L/L se il risultato appare associato a problematiche da iperviscosità.

IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; ASCP, American Society for Clinical Pathology; RCP, Royal College of Pathologists; PT, tempo di protrombina; INR, rapporto internazionale normalizzato; TAO, terapia anticoagulante orale; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivata.

operativa di nefrologia, e la soglia per la comunicazione del valore critico può essere più alta per quel reparto. Possono inoltre essere presi in considerazione il rischio imminente per il paziente e infine la necessità di un'azione da parte del clinico, per la quale risulta fondamentale la notifica tempestiva da parte del laboratorio (42).

La lista di valori critici definita e specifica per ogni realtà clinico-assistenziale, assieme alla relativa procedura, sono rese disponibili per consultazione del personale sanitario dipendente e in convenzione, dei pazienti e delle loro associazioni.

Il processo di comunicazione dei valori critici avviene fra unità inviante (UI) e unità ricevente (UR) ed è un processo di invio/ricezione di informazioni, secondo modalità già condivise prima del momento in cui avviene la comunicazione stessa e descritte da una procedura. Il processo di comunicazione ha come contenuto la notifica del valore critico o a rischio significativo, definito secondo la lista di valori di cui sopra. La comunicazione della notifica avviene mediante una doppia modalità comunicativa, in forma verbale e in forma scritta.

I mezzi comunicativi per la forma verbale comprendono l'interazione diretta (faccia a faccia), il

Tabella 2*Costituenti biologici e rispettivi limiti critici pediatrici (neonato)*

Esame	Unità	IFCC ⁴⁵		ASCP ⁴⁶	
		Limite inferiore	Limite superiore	Limite inferiore	Limite superiore
<i>Ematologia</i>					
Leucociti	10 ⁹ /L	<5	>25	—	—
Emoglobina	g/L	<85	>230	<100	>220
Ematocrito	L/L	<0,33	>0,71	<0,33	>0,71
Piastrine	10 ⁹ /L	<100	—	<50	>900
<i>Chimica Clinica</i>					
Bilirubina	μmol/L	—	>239	—	>256,5
	mg/dL	—	> 14	—	>15
Glucosio	mmol/L	<1,7	>18	< 1,7	>18
	mg/dL	<30	>325	<30	>325
Potassio	mmol/L	<2,6	>7,7	<2,8	>7,8
Sodio	mmol/L	—	—	<121	>156
PO ₂ (Pressione parziale di ossigeno)	mm Hg	<37	—	<40	>100
PCO ₂ (pressione parziale dell'anidride carbonica)	mm Hg	—	—	<20	>63
Ammonio	μmol/L	—	—	—	>110
	μg/dL	—	—	—	>154
Creatinina	μmol/L	—	—	—	>335,9
	mg/dL	—	—	—	>3,8
Urea	mmol/L	—	—	—	>19,6
	mg/dL	—	—	—	>55

IFCC, *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; ASCP, *American Society for Clinical Pathology*.

telefono e altri mezzi di trasmissione simultanea della voce umana. I mezzi comunicativi per la forma scritta sono supporti esterni cartacei e mezzi telematici di invio e visualizzazione delle informazioni. La sicurezza dell'avvenuta comunicazione della notifica e dell'avvenuta comprensione della stessa sono garantite da un doppio controllo simultaneo incrociato del contenuto della notifica da parte dell'operatore della UI e dell'operatore della UR. La comunicazione della notifica di valori critici da parte dell'operatore inviante mediante il canale verbale è preceduta dall'identificazione reciproca degli operatori inviante e ricevente e ha come contenuto:

- nome e cognome del paziente;
- data di nascita (per disambiguare eventuali omonimie);
- valore critico rilevato;
- unità di misura (sempre) e intervallo di riferimento (se necessario).

Al termine della comunicazione verbale l'operatore inviante chiede conferma della corretta comprensione ("read-back") di quanto comunicato all'operatore

ricevente. In caso di errore viene nuovamente comunicato solo il contenuto oggetto dell'errore.

Simultaneamente alla comunicazione verbale gli operatori inviante e ricevente verificano mediante un supporto esterno cartaceo o digitale telematico il contenuto della comunicazione:

- nome e cognome del paziente;
- data di nascita (per disambiguare eventuali omonimie);
- valore critico rilevato;
- data e ora dell'avvenuta comunicazione (registrata solo su supporto esterno);
- nome e cognome dell'operatore (o matricola sanitaria) inviante e ricevente (registrata solo su supporto esterno);
- gli operatori validano in forma scritta l'avvenuta comunicazione e la comprensione della notifica di valore critico apponendo la rispettiva firma.

In caso di supporto esterno digitale telematico gli operatori inviante e ricevente verificano e confermano le informazioni trasmesse e registrano nome e cognome (o

Tabella 3

Risultati critici per esami di microbiologia e infettivologia

IFCC ⁴⁵	ASCP ⁴⁶	RCP ⁴⁷
Positività per parassiti ematici (malaria)	Positività per parassiti ematici (malaria)	Positività per parassiti ematici (malaria)
Rilevazione antigenica con test rapidi di agenti patogeni come es. Streptococchi Gruppo B, <i>Legionella</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Cryptococcus</i> , Epatite B	Positività di test rapidi o alla colorazione di Gram nel fluido spinale cerebrale, sangue o liquidi biologici	Positività per infezioni in comunità causanti epidemia (es, influenza, morbillo, parotite, norovirus, salmonella, <i>Escherichia Coli</i> O157, difterite, "Severe Acute Respiratory Syndrome", ecc.)
Rilevamento di bacilli acido-resistenti o rilevazione di <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dopo amplificazione ("polymerase chain reaction")	Positività nelle emocolture, colture di liquor o liquidi biologici	Infezioni acute in gravide con rischio per contatto al neonato (ad es, parvovirus B19, rosolia, varicella, tampone vaginale positivo per Streptococco gruppo A)
Rilevamento colturale di <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>B. pertussis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>C. diphtheriae</i> e funghi patogeni come <i>Aspergillus</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Coccidioides</i> , <i>Histoplasma</i> e <i>Cryptococcus</i>	Positività nelle copro colture per organismi selezionati	Epatite virale acuta (A o B)
Positività per anticorpi HIV		Ogni infezione che richieda la notifica alle Agenzie di protezione della salute
Rilevazione di agenti patogeni con colorazione di Gram in colture di sangue, essudati e trasudati		Positività alle emocolture

IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; ASCP, American Society for Clinical Pathology; RCP, Royal College of Pathologists.

matricola sanitaria) dell'operatore inviante e ricevente.

In caso di supporto cartaceo esterno le strutture si dotano di schede per la comunicazione dei valori critici, su cui vanno riportate, oltre al valore critico comunicato, la data e ora dell'avvenuta comunicazione, e il proprio nome e cognome (o matricola sanitaria).

Sul referto del valore critico, l'operatore inviante una volta terminato il processo di comunicazione della notifica, indicherà che la comunicazione è avvenuta secondo procedura. L'operatore ricevente include nella documentazione clinica la scheda di notifica

Ruoli

Gli operatori dell'unità inviante e dell'unità ricevente abilitati a inviare e ricevere le comunicazioni sono, per l'unità inviante, tutte le figure sanitarie in ruolo ufficialmente riconosciute dal direttore del laboratorio e possono quindi comprendere dirigenti medici, biologi, chimici, specializzandi, e tecnici di laboratorio biomedico in servizio formati alla procedura di sicurezza di comunicazione.

Per l'unità ricevente, i medici che hanno in carico il paziente, medici di guardia in servizio preferibilmente formati alla procedura di sicurezza di comunicazione. In caso di irreperibilità temporanea o di indisponibilità momentanea (ad esempio qualora il medico sia impegnato in un'emergenza) del medico curante dell'unità ricevente l'operatore dell'unità inviante

posticipa la comunicazione se il grado di priorità temporale della notifica lo permette, altrimenti si mette in contatto con l'operatore che ha qualifica gerarchica di grado superiore al medico curante come il primario direttore di struttura complessa o dipartimentale, il direttore di dipartimento, il direttore di presidio e/o sanitario della struttura.

Valutazione

La valutazione del tempo medio per la comunicazione dei risultati critici e la percentuale delle notifiche effettuate nel tempo stabilito devono rientrare nel sistema di indicatori dell'attività stessa. Studi interni di esito, finalizzati a valutare la distribuzione dei limiti per specifici parametri possono fornire informazioni aggiuntive e criteri per la valutazione globale del processo.

RACCOMANDAZIONI

Le raccomandazioni sono scritte in corsivo, seguite talora da commenti e spiegazioni. A fianco di ogni raccomandazione è espresso il grado di consenso raggiunto, in termini di fiducia nelle prove disponibili in letteratura e la raccomandazione finale, secondo le Tabelle 4 e 5.

Raccomandazione	Nota	Forza della raccomandazione	Fiducia nella raccomandazione
<i>Il processo di condivisione produce la lista dei risultati critici adattata alle caratteristiche di ogni singolo reparto. La condivisione della lista dei risultati critici è una fase integrante della procedura stessa e ne rappresenta una componente imprescindibile, in quanto definisce il contesto comunicativo di riferimento all'interno dell'organizzazione sanitaria in cui si colloca la procedura di comunicazione dei valori critici.</i>		A	
<i>La lista dei risultati critici e dei risultati di rischio significativo con la selezione dei parametri, comprende i valori soglia (alto e/o basso), le unità di misura, il tempo massimo di notifica, il riferimento per il riconoscimento della criticità. La lista è richiamata in procedura ed è pubblicata in tabelle strutturate. Per alcuni parametri deve essere indicata anche la soglia di criticità dovuta a una variazione significativa rispetto ai risultati precedenti in un periodo di tempo ben definito (delta check). La lista è aggiornata periodicamente ed è accessibile e consultabile da tutti gli operatori interessati.</i>		A	
<i>La comunicazione dei risultati/valori critici e la corretta gestione della criticità dei risultati, compreso il monitoraggio continuo dell'efficacia delle modalità operative attuate per identificare, comunicare e assicurare la ricezione dei risultati critici, è una responsabilità della medicina di laboratorio.</i>	Il fine ultimo del processo di comunicazione è permettere un appropriato intervento terapeutico basato sull'informazione di laboratorio, e deve essere visto come parte del processo globale delle analisi di laboratorio ("Total Testing Process", TTP) che spazia dall'appropriatezza della richiesta all'interpretazione dei risultati. Il TTP richiede, nella fase post-analitica, il contributo del laboratorio per migliorare gli esiti complessivi del paziente anche in termini di diagnosi e trattamento appropriati, riduzione di morbidità e mortalità, oltre a una reperibilità medica per l'eventuale consulenza clinica nell'interpretazione della criticità del risultato.	A	⊕⊕⊕⊕
<i>Il processo di comunicazione deve essere globalmente riportato in procedure scritte in conformità al Sistema Qualità e agli standard di accreditamento del laboratorio adottato.</i>		A	⊕⊕⊕⊕
<i>La valutazione del tempo medio per la comunicazione dei valori critici e la percentuale delle notifiche effettuate nel tempo stabilito devono rientrare nel sistema di indicatori.</i>	Ulteriori studi interni di esito, finalizzati a valutare la distribuzione dei limiti per specifici parametri, possono fornire informazioni aggiuntive e criteri per la valutazione globale del processo.	A	⊕⊕⊕⊕
<i>Devono essere definite le responsabilità, in particolare i criteri stabiliti per l'autorizzazione del personale preposto alla notifica, e le competenze acquisite.</i>	Il personale che comunica la notifica (operatore inviante) deve essere competente per garantire la sicurezza dei pazienti e aver ricevuto una formazione specifica sugli aspetti di sicurezza del paziente legati alla comunicazione e deve essere infine a conoscenza della normativa vigente per il rispetto della privacy. Secondo la Linea Guida GP 47 del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), chi comunica il risultato critico non può essere la stessa persona che ha eseguito l'esame. Operatore inviante: competenze riconosciute di medicina di laboratorio, patologia clinica, biochimica clinica, microbiologia. Professionalità abilitate e riconosciute dalla normativa vigente, in possesso di diploma di specializzazione se richiesto dal ruolo professionale. Medici, biologi, chimici impiegati come dirigenti, specializzandi e tecnici sanitari di laboratorio biomedico. Per tutte queste figure professionali è necessario prevedere una formazione specifica sulla procedura di comunicazione. Operatore ricevente: medici di tutte le discipline compresi medici di medicina generale e pediatri di libera scelta, personale infermieristico con ruoli di coordinamento e case management.	A	⊕⊕⊕⊕

Raccomandazione	Nota	Forza della raccomandazione	Fiducia nella raccomandazione
<i>La comunicazione deve essere ricevuta dalla persona in grado di adottare provvedimenti idonei, che è rappresentata ovviamente dal curante o altra persona autorizzata nel caso dei pazienti ricoverati, come ad esempio il medico di guardia dell'Unità Operativa, mentre per i pazienti ambulatoriali esterni è il medico di famiglia o suo sostituto/delegato e il pediatra del territorio o suo sostituto/delegato.</i>		A	⊕⊕⊕⊕
<i>La notifica può essere effettuata anche a professionisti sanitari con l'autorità delegata (ad esempio infermieri) che acquisiscono il ruolo di intermediario della notifica.</i>		B	⊕⊕⊕
<i>Deve essere descritta la politica del percorso da adottare in situazioni in cui la notifica non abbia successo e il curante o qualsiasi operatore sanitario responsabile non possa essere raggiunto.</i>	In questa scelta, dovrebbe essere privilegiata la modalità che garantisce la comunicazione più rapida possibile. Questa disposizione è maggiormente valida per i pazienti ambulatoriali. Nel caso di impossibilità di contattare il medico curante dopo vari tentativi, può per esempio essere avvisato il paziente e, nel suo interesse, diventa responsabilità del laboratorio la scelta delle modalità e di quale provvedimento adottare. Come azione estrema, per casi in cui sia indispensabile raggiungere il paziente appena possibile, è valutabile l'ipotesi di contattare l'autorità di pubblica sicurezza per raggiungere il paziente.	A	⊕⊕⊕
<i>E' responsabilità del laboratorio determinare con quali strumenti effettuare la notifica e i criteri di scelta di questi strumenti.</i>	Attualmente, la notifica viene comunemente effettuata per telefono, ma sistemi di notifica tramite strumenti gestiti dalla tecnologia informatica si stanno rapidamente diffondendo. La notifica effettuata a mezzo fax o con segreteria telefonica non è accettabile eccetto quando possa essere garantita la privacy e la globale e intera tracciabilità della notifica, compreso la riprova del "read-back".	B	⊕⊕⊕⊕
<i>Qualunque sia il sistema di notifica, deve essere documentata la tracciabilità di ogni azione che deve essere registrata, sia per i risultati critici, sia per quelli a rischio significativo.</i>	Gli elementi devono essere tracciati e registrati per garantire un'accurata modalità di notifica. Quindi, chi effettua la notifica di un risultato critico o a rischio significativo deve registrare: <ul style="list-style-type: none"> - l'identificazione del paziente e, per garantire la corretta identificazione nella comunicazione si devono utilizzare almeno due informazioni anagrafiche (nome, cognome e data di nascita, o genere), l'unità operativa di degenza o la provenienza se ambulatoriale. nella registrazione deve essere riportato, anche in modalità automatica tramite il sistema informativo del laboratorio, il codice di riferimento anagrafico univoco attribuito al paziente e al campione, quando disponibile; - l'identità e il ruolo/professione di chi sta ricevendo la notifica e, nel caso la notifica non sia ricevuta da chi dovrà effettuare l'intervento terapeutico, richiedere con che modalità e quando verrà effettuato il trasferimento della comunicazione, l'identità e il ruolo professionale di chi riceverà la notifica finale; - effettuare la procedura di "read-back" ovvero richiedere a chi riceve la comunicazione di scrivere le informazioni notificate e di rileggere successivamente quanto riportato, ovvero nome, cognome e data di nascita del paziente, il parametro e il valore critico o a rischio significativo; - data e ora della notifica. Nel caso non sia tracciabile dalla documentazione del laboratorio anche l'orario di verifica e disponibilità del risultato critico; - identità e ruolo professionale di chi ha effettuato la notifica. 	A	⊕⊕⊕⊕

Raccomandazione	Nota	Forza della raccomandazione	Fiducia nella raccomandazione
<i>Il processo di notifica deve essere regolarmente valutato con indicatori definiti dal laboratorio e che devono valutare le prestazioni della gestione del processo.</i>	La scelta degli indicatori dovrebbe considerare scopi e obiettivi, il razionale, la metodologia di raccolta dei dati, la frequenza, la valutazione statistica e il valore soglia di intervento. L'indicatore principale è rappresentato dal tempo di notifica, cioè l'intervallo temporale che intercorre dalla disponibilità del risultato alla sua comunicazione. Altro criterio suggerito è la percentuale delle notifiche nell'intervallo temporale stabilito, meglio se suddiviso per tipologia di pazienti (interni ed esterni). La valutazione degli indicatori può essere effettuata secondo le raccomandazioni del Gruppo di lavoro "Laboratory Errors and Patient safety" della IFCC (IFCC WG-LEPS) anche con la partecipazione attiva al programma che permette una comparazione tra pari delle proprie prestazioni (40), permettendo così il confronto tra le diverse istituzioni e fornendo una misurazione oggettiva delle prestazioni in metrica "Six sigma". Auspicabilmente, il 100% dei risultati critici o a rischio significativo dovrebbe essere comunicato nell'intervallo temporale stabilito.	B	⊕⊕⊕
<i>La valutazione delle prestazioni deve essere documentata in modo pianificato e discusso tra il personale di laboratorio al fine di verificare l'efficacia del processo di comunicazione dei risultati critici.</i>	La documentazione deve essere focalizzata soprattutto all'analisi dei rischi, con particolare riguardo alla notifica informatica e ai casi in cui gli obiettivi di performance non siano soddisfatti.	B	⊕⊕⊕
<i>La revisione delle procedure e l'aggiornamento della gestione dei processi devono essere dichiarati.</i>		B	⊕⊕⊕
<i>Devono essere pianificati degli audit interni.</i>	Gli audit interni possono essere focalizzati su particolari attività, onde realizzare in un arco temporale stabilito (ad esempio ogni uno o due anni) l'analisi di tutte le attività del processo per valutarne la conformità e l'efficacia clinica e per pianificare eventuali azioni di miglioramento.	B	⊕⊕⊕
<i>Nelle procedure scritte devono essere dichiarate le politiche del laboratorio per:</i>	Anche in queste situazioni particolari, il processo deve essere organizzato per garantire la maggior efficacia possibile, descrivendo il flusso di comunicazione, le responsabilità e le competenze delle figure professionali coinvolte nella gestione del processo.	B	⊕⊕⊕
- <i>la gestione per specifiche Unità Operative (ad esempio le analisi condotte nei laboratori satelliti per oncologia od oncoematologia, o di rianimazioni o terapie intensive, comprese quelle post-operatorie TIPO, queste possono essere definite come esami critici)</i>		B	⊕⊕⊕
- <i>la gestione di risultati critici ricorrenti nello stesso paziente</i>		B	⊕⊕⊕
- <i>la gestione di risultati critici di campioni di pazienti provenienti da altri laboratori.</i>		B	⊕⊕⊕

Tabella 4

Classificazione della fiducia nelle prove disponibili in letteratura. La "forza delle raccomandazioni" che da esse possono essere derivate, sono state espresse in lettere, da A a D, come esplicito in Tabella 5

Fiducia nelle prove disponibili in letteratura	Classificazione	
E' molto improbabile che ulteriori studi cambino la fiducia nella stima dell'effetto osservato	⊕⊕⊕⊕	Alta
Ulteriori studi possono avere un impatto importante sulla fiducia nella misura dell'effetto osservato e possono cambiare la stima	⊕⊕⊕	Moderata
E' molto probabile che ulteriori studi abbiano un impatto importante sulla fiducia nella stima dell'effetto osservato ed è probabile che cambino la stima	⊕⊕	Bassa
Ogni stima di effetto è molto incerta	⊕	Molto bassa

Tabella 5

Classificazione della forza delle raccomandazioni

Indice	Definizione
A	SI RACCOMANDA PRO L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità, anche se non necessariamente di tipo I o II.
B	SI SUGGERISCE PRO Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba sempre essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata.
C	SI SUGGERISCE CONTRO Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o l'intervento.
D	SI RACCOMANDA CONTRO L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente sconsigliata.

CONCLUSIONI

L'adozione di una procedura efficiente per la comunicazione dei valori/risultati critici è tuttora imprescindibile per motivi clinici, etici, organizzativi, per la sua inclusione nel sistema qualità e per le potenziali ricadute giurisprudenziali legate alla mancata notifica di risultati di laboratorio potenzialmente rischiosi per il paziente. Esiste inoltre una forte interazione tra il concetto di valore critico, rischio clinico, prevenzione e riduzione degli errori e comunicazione tra i professionisti della sanità. L'approccio al processo dei risultati critici o a quelli a rischio significativo implica quindi una forte interazione culturale tra tutte le professioni della sanità. Pertanto, la SIBioC e la SIPMeL, per mezzo del Gruppo di Studio Intersocietario sulla Variabilità extra-analitica del dato di laboratorio, con la collaborazione con Gruppo di studio Rischio Clinico della SIBioC e della Società Italiana di Ergonomia e fattori umani (SIE), propongono in questa pubblicazione raccomandazioni, definite con il metodo delle conferenze di consenso, sull'identificazione e comunicazione dei valori critici nei laboratori clinici, riscontrati sia per esami in urgenza che per quelli ordinari. Questo approccio, originariamente ideato dai "National Institutes of Health" e successivamente

ripreso e utilizzato con modifiche e aggiustamenti sia da agenzie di "Health Technology Assessment" di vari Paesi, sia da società scientifiche e singoli gruppi professionali, consiste nella stesura di raccomandazioni da parte di un collegio al termine di una presentazione e consultazione di esperti che sintetizzano le conoscenze scientifiche su un dato argomento (43). L'analisi critica della letteratura, condotta preliminarmente dal comitato promotore, permette un confronto tra prove disponibili e pareri o relazioni degli esperti. La scelta è in linea con le attuali indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che prevede di utilizzare questa soluzione qualora: a) il tema da trattare sia limitato e possa essere suddiviso in pochi quesiti principali, b) il tema da trattare sia controverso (non sono disponibili al momento dell'emanazione del suddetto documento linee-guida o raccomandazioni di consenso definitive in ambito nazionale), e c) necessita di un dibattito pubblico e una presa di posizione per la pratica clinica e indirizzi per lo sviluppo della ricerca. In attesa che sia reso disponibile un ulteriore sistema unificato e condiviso, in accordo con il Programma Nazionale per le Linee Guida (44), le raccomandazioni sono prodotte con un sistema, per quanto riguarda la forza delle raccomandazioni che da esse possono essere derivate, espresso in lettere (da A a D).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Lundberg GD. When to panic over abnormal values. *Med Lab Obs* 1972;4:47-54.
2. Singh H, Vij MS. Eight recommendations for policies for communicating abnormal test results. *Jt Comm J Qual Patient Saf* 2010;5:226-32.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Management of Critical- and Significant-Risk Results, 1st Ed. CLSI Guideline GP47. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
4. Campbell CA, Georgiou A, Westbrook JI, et al. What alert thresholds should be used to identify critical risk results: a systematic review of the evidence. *Clin Chem* 2016;62:1445-57.
5. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Integration of data derived from biological variation into the quality management system of medical laboratories. *Accredit Qual Assur* 2004;9:128-31.
6. Guidi GC, Lippi G, Solero GP, et al. Managing transferability of laboratory data. *Clin Chim Acta* 2006;374:57-62.
7. O'Kane MJ, Lopez B. Explaining laboratory test results to patients: what the clinician needs to know. *BMJ* 2015;351:h5552.
8. Oosterhuis WP, Ulenkate HJ, Goldschmidt HM. Evaluation of LabRespond, a new automated validation system for clinical laboratory test results. *Clin Chem* 2000;46:1811-7.
9. Heilmann E, Friese P, Anderson S, et al. Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span. *Br J Haematol* 1993;85:729-35.
10. Lum G. Evaluation of a laboratory critical limit (alert value) policy for hypercalcemia. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:633-6.
11. Dighe AS, Rao A, Coakley AB, et al. Analysis of laboratory critical value reporting at a large academic medical center. *Am J Clin Pathol* 2006;125:758-64.
12. Howanitz JH, Howanitz PJ. Evaluation of Total serum calcium critical values. *Arch Pathol Lab Med* 2006;30:828-30.
13. Jenkins JJ, Mac Crawford J, Bissell MG. Studying critical values: adverse event identification following a critical laboratory values study at the Ohio State University Medical Center. *Am J Clin Pathol* 2007;128:604-9.
14. Howanitz JH, Howanitz PJ. Evaluation of total serum calcium critical values. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:828-30.
15. Howanitz JH, Howanitz PJ. Evaluation of serum and whole blood sodium critical values. *Am J Clin Pathol* 2007;127:56-9.
16. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:720-7.
17. Howanitz PJ, Steindel SJ, Heard NV. Laboratory critical values policies and procedures: a College of American Pathologists Q-Probes study in 623 institutions. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:663-9.
18. Piva E, Pelloso M, Penello L, et al. Laboratory critical values: automated notification supports effective clinical decision making. *Clin Biochem* 2014;47:1163-8.
19. Lundberg GD. Critical (panic) value notification: an established laboratory practice policy (parameter). *JAMA* 1990;263:709.
20. The Joint Commission. 2017 National Patient Safety Goals. Ultimo accesso: febbraio 2017. https://www.jointcommission.org/lab_2017_npsgs/
21. UNI EN ISO 15189:2013. Medical laboratories – Requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2013.
22. College of American Pathologists. Laboratory Accreditation Checklists. http://www.cap.org/web/home/lab/accreditation/accreditation-checklists?_afLoop=47059328059480#!%40%40%3F_afLoop%3D47059328059480%26_adf.ctrl-state%3D9hu64zosh_4 (ultimo accesso: gennaio 2018)
23. US Department of Health and Human Services. Clinical Laboratories Improvement Amendments of 1988. Code of the Federal Register, Title 42, Part 493. Washington, DC: 1988.
24. http://www.agenas.it/images/agenas/accreditamento/manuali/4_Proposta%20modello%20accreditamento_Laboratori.pdf (ultimo accesso: gennaio 2018)
25. Sentenza del 5.6.1989 della Pretura di Ivrea. *La Giustizia Penale* 1990;II:682.
26. Ricos C, Garcia-Victoria M, de la Fuente B. Quality indicators and specifications for the extra-analytical phases in clinical laboratory management. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:578-82.
27. Plebani M, Chiozza ML, Sciacovelli L. Towards harmonization of quality indicators in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:187-95.
28. Sciacovelli L, Aita A, Padoan A, et al. Performance criteria and quality indicators for the post-analytical phase. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:1169-76.
29. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-9.
30. Wagar EA, Friedberg RC, Souers R, et al. Critical values comparison: a College of American Pathologists Q-Probes survey of 163 clinical laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1769-75.
31. Tillman J, Barth JH; ACB National Audit Group. A survey of laboratory "critical (alert) limits" in the UK. *Ann Clin Biochem* 2003;40:181-4.
32. Rensburg MA, Nutt L, Zemlin AE, et al. An audit on the reporting of critical results in a tertiary institute. *Ann Clin Biochem* 2009;46:162-4.
33. Gong Y, Adeli K; CSCC Pediatric Focus Group. A national survey on pediatric critical values used in clinical laboratories across Canada. *Clin Biochem* 2009;42:1610-5.
34. Royal College of Pathologists. Out-of-hours reporting of laboratory results requiring urgent clinical action to primary care: Advice to pathologists and those that work in laboratory medicine. Available at: <https://www.rcpath.org/resourceLibrary/out-of-hours-reporting-of-laboratory-results-requiring-urgent-clinical-action-to-primary-care--2010.html>
35. Campbell C, Horvath A. Towards harmonisation of critical laboratory result management - review of the literature and survey of australasian practices. *Clin Biochem Rev* 2012;33:149-60.
36. Zeng R, Wang W, Wang Z. National survey on critical values notification of 599 institutions in China. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2099-107.
37. Kost GJ, Hale KN. Global trends in critical values practices and their harmonization. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:167-76.
38. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: the complete picture. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:741-51.
39. Campbell CA, Horvath AR. Harmonization of critical result management in laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2014;432:135-47.

40. Lippi G, Giavarina D, Montagnana M, et al. National survey on critical values reporting in a cohort of Italian laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1411-3.
41. Piva E, Sciacovelli L, Laposata M, et al. Assessment of critical values policies in Italian institutions: comparison with the US situation. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:461-8.
42. Lippi G, Mattiuzzi C. Critical laboratory values communication: summary recommendations from available guidelines. *Ann Transl Med* 2016;4:400.
43. Fink A, Kosecoff J, Chassin M, et al. Consensus methods: characteristics and guidelines for use. *Am J Public Health* 1984;74:979-83.
44. Programma nazionale per le linee guida. Come produrre, diffondere e aggiornare raccomandazioni per la pratica clinica. Manuale metodologico. Istituto Superiore di Sanità, Maggio 2002. http://www.iss.it/binary/lgmr2/cont/Manuale_PNLG.1234439852.pdf (ultimo accesso: gennaio 2018)
45. Critical Limits of Laboratory Results for Urgent Clinician Notification. *eJIFCC* 2003, vol. 14, n. 1. <http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/140103200303.pdf> (ultimo accesso: Luglio 2017)
46. Genzen JR, Tormey CA; Education Committee of the Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists. Pathology consultation on reporting of critical values. *Am J Clin Pathol* 2011;135:505-13.
47. Danielle Freedman, of behalf of the College's Specialty Advisory Committee on Clinical Biochemistry. Out-of-hours reporting of laboratory results requiring urgent clinical action to primary care: Advice to pathologists and those that work in laboratory medicine. <http://docplayer.net/29308589-November-unique-document-number-document-name.html> (ultimo accesso: febbraio 2018).

Procalcitonina in Terapia Intensiva: più certezze che dubbi

Giuseppe Lippi¹, Camilla Mattiuzzi²

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

²Servizio Governance Clinica, Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento, Trento, Italia

Caro Editore,

La procalcitonina PCT, proteina di 116 aminoacidi precursore dell'ormone calcitonina, è generata dalla proteolisi intracellulare della pre-procalcitonina (1). Malgrado la PCT non eserciti una sostanziale attività ormonale, la sua determinazione ha assunto sostanziale importanza nei laboratori clinici, sia per la diagnosi delle infezioni batteriche (soprattutto quelle sistemiche), sia nell'ambito del processo di gestione della terapia antibiotica o antimicrobica, altresì noto come "stewardship antibiotica" (2). In questo numero di *Biochimica Clinica* è pubblicato un articolo di Dorizzi R et al. sul potenziale utilizzo della determinazione della PCT in terapia intensiva (3). Pur offrendo spunti utili alla discussione, si riconoscono alcuni aspetti meno condivisibili, che si ritiene necessario sottolineare al fine di offrire uno scenario più completo e coerente.

Nonostante appaia sostanzialmente condivisibile la menzione alle linee guida NICE (4), dalle quali si conclude che l'utilizzo della PCT per la "stewardship" antibiotica non fosse ancora supportato da solide evidenze scientifiche al tempo della loro pubblicazione, è altresì importante osservare come il documento sia apparso alla fine del 2015. Le conclusioni delle linee guida NICE sono poi sostanziate da una revisione sistematica della letteratura, apparsa nello stesso periodo, ma basata su una ricerca sistematica della letteratura, conclusasi nel Giugno 2014 (5). Quattro anni in ambito di ricerca biomedica rappresentano un'era geologica. Una ricerca recente su PubMed (8 Marzo 2018), utilizzando come parole chiave "procalcitonin" AND "antibiotic therapy", ha prodotto 135 documenti dal Giugno 2014 a oggi, sui 329 totali. Se fiducia nelle conclusioni del NICE poteva anche essere riposta quasi 4 anni fa, le evidenze scientifiche prodotte nel frattempo rendono queste linee guida ragionevolmente poco aggiornate.

Un secondo aspetto riguarda l'analisi del recente articolo di Funge AWS et al, (6). Giova citare che in questa pubblicazione il ruolo della PCT nella gestione terapeutica di pazienti con sepsi è considerato quantomeno promettente: *"nell'ambito di un appropriato contesto clinico, il monitoraggio seriale della procalcitonina può rappresentare un utile test a supporto della stewardship antibiotica"*, e *"la determinazione della procalcitonina potrebbe avere un ruolo nella stewardship antibiotica soprattutto in presenza di esami colturali negativi"*, e infine *"oltre a dimostrare una riduzione della mortalità, lo studio di de Jong ha dimostrato una riduzione nell'uso di antibiotici, da 7 giorni nel braccio di controllo a 5 giorni in quello guidato dalla procalcitonina"*.

Dorizzi R et al compiono poi una lunga disquisizione sulla pubblicazione della Cochrane Collaboration (7), dalla quale sembrerebbe emergere un ruolo importante della PCT a supporto della "stewardship" antibiotica. Senza entrare nel merito delle critiche a un articolo che è comunque superato da uno successivo, e quindi più aggiornato (8), le conclusioni delle otto meta-analisi ad oggi disponibili in letteratura sono tutte concordi in un aspetto, e cioè che la gestione del paziente guidata dai valori di questo biomarcatore appaia efficace nel ridurre l'utilizzo degli antibiotici (solo in una di esse il trend non raggiunge la significatività statistica), riportando talora un favorevole rapporto costo/beneficio (quando questo aspetto è stato analizzato) e spesso una riduzione della mortalità (9-16). Sembra alquanto difficile ipotizzare che quest'ampia mole di evidenze scientifiche abbia sofferto, nella sua produzione, di bias di selezione, di un'analisi faziosa da parte degli Autori, o che sia stata influenzata da lobby dell'industria del diagnostico. Inoltre, se è pur vero che dalla meta-analisi di Andriolo BN et al non sembrerebbe emergere un ruolo determinante della PCT nel ridurre la mortalità a breve e medio termine in pazienti con sepsi (14), il livello delle evidenze rimane molto basso o moderato, e si evidenzia comunque un trend significativo nella riduzione della durata della terapia antibiotica (-1,3 giorni; intervallo di confidenza al 95%, da -1,9 a -0,6 giorni). Quanto sia oggi importante questo aspetto nel prevenire la sempre più diffusa resistenza batterica agli antibiotici appare finanche pleonastico rammentarlo (17). Si fa peraltro notare che due linee guida molto recenti della Society of Critical Care

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Verona, Piazzale L.A. Scuro, 37100 Verona. E-mail giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 14.03.2018

Revisionato: 15.03.2018

Accettato: 15.03.2018

Pubblicato on-line: 23.04.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.024

Medicine/European Society of Intensive Care Medicine (SCCM/ESICM) (18) e Infectious Diseases Society of America (IDSA) Sepsis Task Force (19) esprimono entrambe un sostanziale consenso in merito all'efficacia della PCT sia nella diagnosi di sepsi e shock settico, sia nell'indirizzare la conseguente terapia antimicrobica.

Appare poi discutibile la considerazione che il laboratorio possa già oggi disporre di test di biologia molecolare idonei. In primis, ipotizzare che "in pochi minuti" si possa arrivare a una diagnosi definitiva dell'agente patogeno è alquanto irrealistico, poiché le tecniche di biologia molecolare oggi disponibili nei laboratori clinici consentono di ottenere risultati in non meno di 1 ora, ma che possono protrarsi finanche a 12 ore (il turnaround time è generalmente compreso tra 2 e 6 ore) (20, 21). Una seconda criticità è rappresentata dalla dotazione strumentale necessaria alla diagnosi di sepsi con tecniche di biologia molecolare, non accessibili per tutti i laboratori clinici, soprattutto quelli periferici. Dotare di piattaforme di biologia molecolare tutti i presidi in cui siano presenti reparti di medicina d'urgenza e/o terapia intensiva comporterebbe costi insostenibili alla luce delle limitate risorse a disposizione del Servizio Sanitario Nazionale. In sintesi, la spesa per attivare diffusamente test di biologia molecolare eccederebbe in larga misura il costo necessario alla determinazione della PCT, altresì criticato nell'articolo di Dorizzi R et al. Infine, le tecniche di biologia molecolare disponibili per la diagnosi rapida di sepsi hanno prestazioni molto eterogenee, con sensibilità e specificità diagnostiche largamente dipendenti dal pannello di sonde utilizzate, non sempre adeguate al contesto clinico, e comunque lontane da renderle (almeno oggi) un "faro nella nebbia" (20).

Pur comprendendo i dubbi sollevati da Dorizzi R et al, alla luce delle evidenze scientifiche disponibili e delle raccomandazioni di consenso recentemente pubblicate da SIBioC-Medicina di Laboratorio e dall'Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) (22), le perplessità cliniche, organizzative ed economiche che confuterebbero il ruolo della PCT nella gestione dei pazienti in terapia intensiva non appaiono condivisibili nel loro complesso. Tanto più quando le critiche sono sollevate da un Autore che sembra credere fermamente nella medicina basata sull'evidenza, come riporta (testualmente) in una sua traduzione del "Sicily statement on evidence-based practice" *"Una randomizzazione inadeguata o dei bias di pubblicazione possono causare una sovrastima drammatica dell'efficacia terapeutica. Per ovviare a questi rischi sono state sviluppate le risorse pre-selezionate e pre-valutate come le revisioni sistematiche della Cochrane Collaboration"* (23).

La potenziale utilità della PCT è anche supportata dai risultati di un ampio studio americano, basato su 132.112 pazienti critici, dal quale si evince chiaramente come la determinazione della PCT in terapia intensiva consenta di ridurre il tempo di permanenza in ospedale e in terapia intensiva, generando un sostanziale risparmio economico (24). La considerazione che le indagini molecolari rapide (soprattutto quantitative) rappresenteranno una svolta epocale nella diagnosi eziologica e nella gestione terapeutica della sepsi sembra invece più condivisibile. Ciononostante, le prospettive appaiono oggi ancora enigmatiche, anche alla luce dei risultati di uno studio recente dal quale sembrerebbe emergere che l'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare per guidare la terapia antibiotica nei pazienti con sepsi possa addirittura generare un impatto negativo sugli esiti (25).

CONFLITTO DI INTERESSI

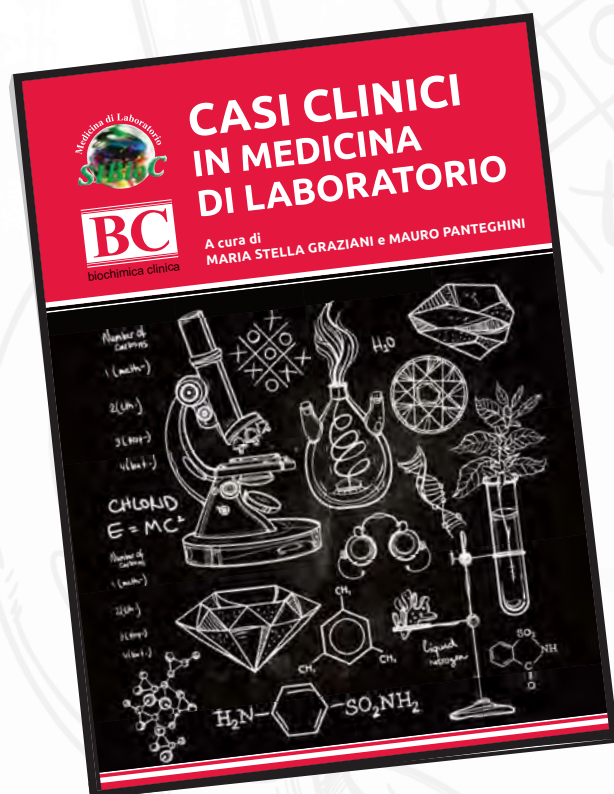
Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Sanchis-Gomar F. Procalcitonin in inflammatory bowel disease: drawbacks and opportunities. *World J Gastroenterol* 2017;23:8283-90.
2. Plebani M, Fabbri LM. Procalcitonin-guided antibiotic therapy: a potentially effective and efficient strategy. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:519-20.
3. Dorizzi RM, Azzini AM, Sette P. La procalcitonina in terapia intensiva: dubbi che rimangono? *Biochim Clin* 2018;42:146-51.
4. National Institute for Health and Care Excellence. NICE Procalcitonin testing for diagnosing and monitoring sepsis (ADVA Centaur BRAHMS PCT assay, BRAHMS PCT Sensitive Kryptor assay, Elecsys BRAHMS PCT assay, LIAISON BRAHMS PCT assay and VIDAS BRAHMS PCT assay). *Diagnostics guidance* <https://www.nice.org.uk/guidance/dg18> (ultimo accesso: 6 febbraio 2018).
5. Westwood M, Ramaekers B, Whiting P, et al. Procalcitonin testing to guide antibiotic therapy for the treatment of sepsis in intensive care settings and for suspected bacterial infection in emergency department settings: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 2015;19(96):v-xxv, 1-236.
6. Fung AWS, Beriault D, Diamandis EP, et al. The role of procalcitonin in diagnosis of sepsis and antibiotic stewardship: opportunities and challenges. *Clin Chem* 2017;63:1437-41.
7. Schuetz P, Müller B, Christ-Crain M, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;9:CD007498.
8. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;10:CD007498.
9. Kopterides P, Siempos II, Tsangaris I, et al. Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med* 2010;38:2229-41.
10. Heyland DK, Johnson AP, Reynolds SC, et al. Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in the critical care setting: a systematic review and an economic evaluation. *Crit Care Med* 2011;39:1792-9.

11. Schuetz P, Chiappa V, Briel M, et al. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. *Arch Intern Med* 2011;171:1322-31.
12. Soni NJ, Samson DJ, Galaydick JL, et al. Procalcitonin-guided antibiotic therapy: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Med* 2013;8:530-40.
13. Prkno A, Wacker C, Brunkhorst FM, et al. Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock--a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2013;17:R291.
14. Andriolo BN, Andriolo RB, Salomão R, et al. Effectiveness and safety of procalcitonin evaluation for reducing mortality in adults with sepsis, severe sepsis or septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;1:CD010959.
15. Iankova I, Thompson-Leduc P, Kirson NY, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in patients with suspected or confirmed sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2018;46:691-8.
16. Lam SW, Bauer SR, Fowler R, et al. Systematic review and meta-analysis of procalcitonin-guidance versus usual care for antimicrobial management in critically ill patients: focus on subgroups based on antibiotic initiation, cessation, or mixed strategies. *Crit Care Med* 2018;46:684-90.
17. Marston HD, Dixon DM, Knisely JM, et al. Antimicrobial Resistance. *JAMA* 2016;316:1193-204.
18. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 *Crit Care Med* 2017;45:486-552.
19. Gilbert DN, Kalil AC, Klompas M, et al. IDSA Position Statement: Why IDSA did not endorse the surviving sepsis campaign guidelines. *Clin Infect Dis* 2017. doi: 10.1093/cid/cix997.
20. Guido M, Tumolo MR, De Donno A, et al. In vitro diagnosis of sepsis: a review. *Pathol Lab Med Int* 2016;8:1-14.
21. Rutanga JP, Nyirahabimana T. Clinical significance of molecular diagnostic tools for bacterial bloodstream infections: a systematic review. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2016;2016:6412085.
22. Lippi G, Montagnana M, Balboni F, et al. Biomarkers for diagnosing sepsis in the emergency department: a consensus document by SIBioC-Medicina di Laboratorio and the Academy of Emergency Medicine and Care. *Biochim Clin* 2018;42:62-73.
23. Dorizzi RM, Caputo M, Esposito E. Dichiarazione siciliana sulla pratica basata sull'evidenza. *RIMeL/IJLaM* 2007;3:164-70.
24. Balk RA, Kadri SS, Cao Z, et al. Effect of procalcitonin testing on health-care utilization and costs in critically ill patients in the United States. *Chest* 2017;151:23-33.
25. Andrej M, Andreja S. Mortality, intensive care treatment, and cost evaluation: Role of a polymerase chain reaction assay in patients with sepsis. *J Int Med Res* 2018;46:79-88.

2 (eth-)
3 (prop-)
4 (but-)



È disponibile il volume

Casi Clinici in Medicina di Laboratorio

L'acquisto di una copia consente l'accesso gratuito

ai **Corsi FAD ECM 1 e 2** relativi ai

Casi Clinici in Medicina di Laboratorio

inclusi nel volume

Acquistalo sul sito www.biomedica.net

Catalogo corsi FAD

Casi Clinici in Medicina di Laboratorio I*

Coordinatore: Bruna Lo Sasso

10 crediti ECM

Casi Clinici in Medicina di Laboratorio II*

Coordinatore: Bruna Lo Sasso

11 crediti ECM

Qualità in Medicina di Laboratorio: i programmi di VEQ

Coordinatore: Massimo Quercioli

8 crediti ECM

Biomarcatori in oncologia

Coordinatori: Massimo Gion, Chiara Trevisiol

10 crediti ECM

Appropriatezza prescrittiva nell'ambulatorio del medico di medicina generale

Coordinatori: Mariastella Graziani, Marcello Ciaccio, Bruna Lo Sasso

15 crediti ECM

Emostasi e trombosi: il valore del laboratorio

Coordinatore: Sophie Testa

5 crediti ECM

**Iscrizione gratuita previo acquisto del volume "Casi clinici in Medicina di Laboratorio"*

Per visionare l'offerta formativa SIBioC completa seguici su **www.sibioc.it**

