
BC

biochimica clinica

In questo numero:

IL LABORATORIO IN TOSSICOLOGIA

vedi pagg. 216, 258



*SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di*

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





11th International Scientific Meeting

MEASUREMENT UNCERTAINTY IN MEDICAL LABORATORIES: FRIEND OR FOE?

MILANO, ITALY
November 30th, 2017

CIRME



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO

Research Centre for Metrological
Traceability in Laboratory Medicine (CIRME)



PROGRAMME

09:15 Registration

10:00 Meeting inauguration

MORNING SESSION

Chairpersons: A. Mosca (Italy), F. Ceriotti (Italy)

10:30 Measurement uncertainty: friend or foe?
M. Panteghini (Italy)

11:00 Defining acceptable limits for combined
uncertainty budget in the implementation of
metrological traceability
F. Braga (Italy)

11:30 Total error in the uncertainty era: which role?
W. Oosterhuis (The Netherlands)

12:00 What information on measurement uncertainty
should be communicated to clinicians, and how?
M. Plebani (Italy)

12:30 Discussion

13:00 Break

AFTERNOON SESSION

Chairpersons: M. Panteghini (Italy), M. Plebani (Italy)

14:00 Defining uncertainty of reference measurement
procedures: sources and performance criteria
A. Mosca (Italy)

14:30 The value-assignment protocol for commercial
calibrators: how to ensure suitable quality of
clinical measurements
T. Orzechowski (USA)

15:00 Deriving proper measurement uncertainty from
Internal Quality Control data: a mission
impossible?
F. Ceriotti (Italy)

15:30 Discussion

16:00 Final remarks
M. Panteghini (Italy)

SPEAKERS & CHAIRPERSONS

F. Braga

Research Centre for Metrological Traceability in
Laboratory Medicine (CIRME), University of Milano,
Italy

F. Ceriotti

Central Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda,
Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

A. Mosca

Research Centre for Metrological Traceability in
Laboratory Medicine (CIRME), University of Milano,
Italy

M. Panteghini

Research Centre for Metrological Traceability in
Laboratory Medicine (CIRME), University of Milano,
Italy

M. Plebani

Department of Laboratory Medicine, University-
Hospital of Padua, Padua, Italy

W. Oosterhuis

Department of Clinical Chemistry and Hematology,
Atrium Medical Center, Heerlen, The Netherlands

T. Orzechowski

Abbott Diagnostics R&D Quality Engineering,
Chicago, USA

ORGANIZING SECRETARIAT

MZ CONGRESSI srl - Federica Bozza
Via C. Farini, 81 - 20159 Milano, Italy
Phone +39 02 66802323 - Fax +39 02 6686699
federica.bozza@mzcongressi.com
www.mzcongressi.com/eventi

CONFERENCE VENUE

AULA MAGNA - LITA SEGRATE
Via Fratelli Cervi, 93 - Segrate, Milano

REGISTRATION FEE € 183,00 (VAT 22% included)

► Special fee for students (including post-graduates)

€ 30,00 (VAT 22% included)

(a document certifying the position is requested)

Supported by an unconditional grant by  **Abbott**

sommario



RASSEGNE

199

Obesità, microbiota e stress ossidativo
A. Vanzo, A. Bolner, G. Nordera, O. Bosello

208

Anemia acquisita da ospedalizzazione: il ruolo delle perdite di sangue a scopo diagnostico
E. Aloisio, S. Pasqualetti, A. Dolci, M. Panteghini

216

Il laboratorio clinico nelle indagini tossicologiche
E. Barzon, V. Balestra, G. Dall'Olio, P. Papa, M. Pellegrini, G. Testino, T. Trenti, A. Veronesi, D. Giavarina

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

228

Espressione e valore prognostico del ciclo cellulare e delle aneuploidie nel mieloma multiplo e nella gammopatia monoclonale di significato indeterminato
I. Sanzio Colloca, M. Caldarella, L. D'Amelio, R. Amodeo, F. Gervasi

235

Durata della fibrinolisi post-operatoria e rischio trombotico dopo somministrazione di acido tranexamico negli interventi di protesi d'anca e ginocchio
L. Erroi, B. Montaruli, V. Camarda, P. Sivera, M. Bruzzone, R. Rossi, M. Migliardi

239

Il microRNA-135b nella caratterizzazione molecolare del carcinoma della mammella "triplo negativo"
G. Pira, L. Murgia, F. Sanges, P. Uva, P. Cossu-Rocca, F. Loi, S. Orrù, M.R. Muroi, C. Carru, A. Angius, M.R. De Miglio

245

Utilità dell'elettroforesi urinaria come metodo di screening per la ricerca della proteina di Bence Jones
M.T. Muratore, L. Fringuelli, R. Carrozza

248

Verso l'armonizzazione dell'analisi delle urine con striscia reattiva: il ruolo di un programma di VEQ
S. Secchiero, M.G. Epifani, M. Plebani

OPINIONI

258

Ruolo e finalità dei laboratori di farmacotossicologia forense
C. Laposata, F. Bortolotti, R. Gottardo, F. Tagliaro

DOCUMENTI

266

Appropriatezza della richiesta di esami ed esiti clinici: il caso delle malattie renali, tiroidee e della celiachia
M. Plebani, R. Tozzoli, T. Trenti, F. Ceriotti, F. Di Serio

CASI CLINICI

e15

Un caso camaleontico di porpora trombotica trombocitopenica (sindrome di Moschcowitz)
G. Lobreglio, F. Guerra, P. Forese

e19

Incremento acuto di troponina I in assenza di malattia coronarica ostruttiva: un caso di sindrome di Takotsubo
C. Bellia, B. Lo Sasso, L. Agnello, G. Bivona, G. Novo, M. Ciaccio

e22

Un caso di mieloma multiplo IgG kappa in cui la misura delle catene leggere libere ha evidenziato precocemente una ripresa di malattia di tipo "light chain escape"
M. Berardi, M. Staderini, A. Terreni, C. Nozzoli, T. Biagioli, M. Brogi, L. Torreni, A. Gironi, F. Cassani, A. Bosi, A. Caldini

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e diretta da Carlo Franzini

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

membro di

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

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

Editor-in-Chief

Mauro Panteghini

Reviews Editor

Maria Stella Graziani

Associate Editors

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

Editorial Secretary

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

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

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

SIBioC Executive Board

2016-2017

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

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282 - Fax. 0245498199



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

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

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo, 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

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

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

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

Associato all'USPI
Unione Stampa
Periodica Italiana
Tiratura di questo
numero 4000 copie
4000 copies of this
issue have been printed
ISSN 0393-0564



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

Volume 41

Numero 3 - Settembre 2017

Obesità, microbiota e stress ossidativo

Angiola Vanzo¹, Andrea Bolner², Giampietro Nordera², Ottavio Bosello³

¹Servizio di Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN), ULSS 6, Vicenza

²Centro Stress Ossidativo (CSOx), Casa di cura privata Villa Margherita, Vicenza

³Dipartimento di Medicina, Università di Verona

ABSTRACT

Obesity, microbiota and oxidative stress. Only in recent years, scientific societies and governments of many countries have considered obesity and its precursors, namely overweight, such as a disease that causes other diseases and reduces life quality and expectancy. According to the latest researches, obesity is a complex disease, with multifactorial etiology, not exclusively linked to eating disorders and lifestyle, which contribute inflammatory, infectious, toxic and also mental phenomena. Among many pathogenetic and pathophysiological invoked mechanisms, the effects of oxidative stress have recently received special attention. The imbalance between the production of free oxygen and nitrogen radicals and the physiological contrast mechanisms could actually play a causal role in the development of obesity by stimulating the deposition of white adipose tissue and altering the assumption of food. Oxidative stress and systemic inflammation are also key factors in the pathogenesis of obesity-related diseases, including atherosclerosis, insulin resistance, type 2 diabetes and cancer. Despite the correlation between obesity and oxidative stress, none of the biochemical markers of oxidative damage can be considered predictive of obesity; on the contrary, some markers seem to predict the development and progression of cardiovascular and metabolic disease in overweight and obese subjects. Recent observations also demonstrate the existence of quantitative and qualitative differences in the intestinal microbiota between individuals at high and low risk of development of obesity and related complications. Therefore, the intestinal microbiota might play a key role in the pathogenesis of obesity.

INTRODUZIONE

Fin dagli anni a cavallo tra V e IV secolo a.C., Ippocrate di Kos parlava dei pericoli per la salute e per la longevità in coloro che erano "assai grassi"; a essi Ippocrate raccomandava di alimentarsi con moderazione senza trascurare l'esercizio fisico. Nel I secolo d.C., Aulo Cornelio Celso confermò i rischi dell'eccesso di adipe che egli chiamò *obesitas*: da allora, soprattutto la medicina araba medievale dedicò molta attenzione al sovrappeso, che iniziò a essere studiato come un vero problema medico. Negli ultimi anni del primo millennio, Avicenna dedicò un'intera sezione del suo Canone di Medicina agli inconvenienti dovuti all'obesità: problemi respiratori, cardiovascolari, infertilità, morte improvvisa. Malgrado queste osservazioni storiche, il giudizio di malattia riferito al sovrappeso è rimasto a lungo incerto nella maggior parte delle culture. Per secoli infatti, fame e denutrizione sono stati problemi dominanti per la maggior parte

dell'umanità e un corpo ben nutrito appariva, prima di tutto, un segno di salute e prosperità. A partire dalla prima metà del XX secolo, il problema dell'obesità è comparso piuttosto regolarmente nei testi di medicina: a esso si riconoscevano, in genere, i rischi che comporta per la salute, ma la scarsa frequenza con cui il fenomeno si riscontrava nella popolazione generale non gli ha permesso di trovare la giusta rilevanza. Anzi, il fatto che obesità e sovrappeso fossero prevalenti nelle classi sociali più agiate ha continuato a conferire loro un'aura di benessere e opulenza. Solo nel secondo dopoguerra e, in modo eclatante, negli ultimi trent'anni, l'obesità è davvero divenuta oggetto di studio della scienza medica.

OBESITÀ: UNA MALATTIA MULTIFATTORIALE

La necessità di avere un approccio multidisciplinare al problema obesità è apparsa ben presto evidente. Che questa condizione avesse una qualche componente

Corrispondenza a: Andrea Bolner, Centro Stress Ossidativo, Casa di cura privata Villa Margherita, Via Costacolonna 6, 36057 Arcugnano (VI). Tel. 0444997099, Fax 0444997099, E-mail bolner.andrea@gmail.com

Ricevuto: 10.09.2016

Revisionato: 16.10.2016

Accettato: 09.11.2016

Publicato on-line: 26.07.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.028

ereditaria, infatti, era noto da tempo: tuttavia, fino a qualche decennio fa, le effettive implicazioni genetiche erano rimaste un fatto quasi del tutto sconosciuto. L'avvento delle nuove tecnologie di indagine e studi su modelli animali hanno in breve tempo permesso di individuare più di 500 geni candidati collegati a questo fenotipo. L'obesità umana appare, oggi, una condizione geneticamente complessa che tende ad associarsi a una moltitudine di complicanze (insulino-resistenza, diabete tipo 2, dislipidemia, arteriosclerosi, ipertensione) influenzate, a loro volta, dallo stile di vita, ma anche legate a predisposizioni genetiche spesso indipendenti l'una dall'altra. Un quadro, dunque, molto difficile da districare e da individuare che fa sospettare come la parola "obesità" sia, in realtà, un ombrello troppo grande che finisce per raccogliere sotto di sé fenomeni anche molto diversi dal punto di vista eziopatologico. Più recentemente, gli studi sul genoma si sono arricchiti con osservazioni di epigenetica che hanno individuato, anche nell'obesità, cause ambientali in grado, a loro volta, di modificare il fenotipo alterando direttamente il genoma attraverso processi di metilazione del DNA e di metilazione e acetilazione delle proteine istoniche.

Stranamente, nonostante i progressi fatti nell'individuazione delle sue basi molecolari, l'obesità rimane a oggi una condizione definita e descritta esclusivamente su base morfologica: eccesso di peso corporeo per eccesso di massa grassa. La diagnosi di obesità dipende, infatti, dalla constatazione che l'indice di massa corporea ["body mass index" (BMI), calcolato come rapporto tra la massa-peso, espressa in kg, e il quadrato dell'altezza, espressa in m] o la percentuale di grasso corporeo ["fat mass" (FM)] di un individuo superano certi limiti convenzionalmente fissati: per BMI, $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ in entrambi i sessi; per FM, $>25\%$ negli uomini e $>32\%$ nelle donne. Non è richiesta, dunque, per la diagnosi la presenza di particolari sintomi o segni, né la compromissione di una o più funzioni fisiologiche.

Altrettanto curiosamente, solo di recente le maggiori istituzioni sanitarie internazionali e i governi di molti paesi hanno finalmente abbracciato l'idea che l'obesità e il suo precursore, il sovrappeso, debbano essere considerate malattie da contrastare in quanto provocano altre malattie e che si tratti di condizioni che riducono qualità e aspettativa di vita (1). Pur riaprendosi di tanto in tanto il dibattito se l'obesità possa essere considerata una vera malattia e se essa costituisca un reale pericolo per la salute (negli ultimi due decenni sono stati, infatti, pubblicati articoli in cui si postula addirittura un ruolo protettivo dell'eccesso ponderale tanto da far parlare del cosiddetto "obesity paradox"), è ormai assodato che l'obesità è una condizione cronica associata a elevata morbilità e mortalità precoce (2). Per tali ragioni gli specialisti sono oggi principalmente impegnati a ricercarne le basi eziologiche che, come già accennato, non paiono affatto scontate. Com'era infatti atteso sulla base delle ipotesi di multifattorialità formulate dai primi ricercatori, il quadro che si va delineando per l'obesità è quello di una patologia complessa non esclusivamente legata a disordini alimentari e dello stile di vita, cui

possono concorrere fenomeni di tipo infiammatorio, infettivo, tossico e anche psichiatrico.

OBESITÀ E STRESS OSSIDATIVO

Recentemente, tra i molti meccanismi eziopatogenetici e fisiopatologici invocati, si è posta particolare attenzione agli effetti conseguenti allo stress ossidativo (3). Il termine stress ossidativo o "squilibrio redox" indica l'insieme delle alterazioni biochimiche che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche quando queste sono esposte a un eccesso di agenti ossidanti: l'effetto è costituito da alterazioni metaboliche, danno e morte cellulare. Lo stress origina da uno sbilanciamento del rapporto tra la produzione di radicali liberi [sia della specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia di quelle dell'azoto (RNS)] e la relativa neutralizzazione metabolica.

Studi epidemiologici, clinici e sperimentali hanno dimostrato che l'obesità è strettamente associata ad alterazioni dello stato redox e al conseguente aumento del rischio metabolico (4-9). Lo stress ossidativo può essere una conseguenza, ma anche una causa dell'obesità. L'ipernutrizione cronica, l'elevato contenuto di grassi, specie grassi saturi (SFA) e acidi grassi di tipo "trans", e di carboidrati nella dieta, specie a basso indice glicemico, stimolano vie intracellulari che portano a stress ossidativo attraverso molteplici meccanismi biochimici, quali la generazione di superossido da parte delle NADPH-ossidasi (Nox), la fosforilazione ossidativa mitocondriale, l'auto-ossidazione della gliceraldeide, l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), le vie dei polioli e delle esosamine (10-12).

Lo stress ossidativo potrebbe svolgere un ruolo causale nello sviluppo dell'obesità, stimolando la deposizione di tessuto adiposo bianco e alterando l'assunzione di cibo: colture cellulari e studi su animali dimostrano che lo stress ossidativo aumenta la proliferazione dei pre-adipociti, la successiva differenziazione degli adipociti e la dimensione degli adipociti maturi (13-15). ROS e RNS sembrano essere coinvolte nel controllo del peso corporeo, esercitando effetti diversi sui neuroni ipotalamici che controllano il comportamento della fame e della sazietà (16).

È stato anche dimostrato che l'obesità è direttamente in grado di indurre stress ossidativo sistemico; infatti, l'accumulo di grasso aumenta l'attività Nox e lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) negli adipociti, comportando un conseguente aumento della produzione di ROS (13, 17). Altri fattori che contribuiscono allo stress ossidativo nell'obesità sono l'anomala generazione post-prandiale di ROS (18), l'iperleptinemia (19), l'infiammazione cronica (20) e la disfunzione tissutale (12) con riduzione delle difese antiossidanti (21, 22). Come dimostrato anche in altre patologie, stress ossidativo e infiammazione sembrano essere strettamente collegati anche nell'obesità, per quanto resti difficile stabilire l'esatta sequenza temporale del loro rapporto. Stress ossidativo sistemico e infiammazione sono fattori chiave anche nella

patogenesi delle malattie correlate all'obesità, tra cui aterosclerosi, insulino-resistenza, diabete di tipo 2 e tumori (23, 24). È stato recentemente ipotizzato che l'aumento dello stress ossidativo e l'infiammazione nell'obesità favoriscano anche i processi di invecchiamento (25).

È noto, al contrario, che la restrizione calorica e la conseguente riduzione ponderale hanno come effetto la riduzione dei marcatori di ossidazione, l'aumento delle difese antiossidanti e il miglioramento del rischio metabolico e cardiovascolare associati all'obesità (26).

RUOLO DI ROS, RNS E BARRIERA ANTIOSSIDANTE

In condizioni fisiologiche, i mitocondri sono il principale sito di produzione intracellulare di ROS. I radicali dell'ossigeno e dell'azoto, tuttavia, possono derivare anche da numerose attività metaboliche di membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico, lisosomi, perossisomi ed enzimi citosolici. È indispensabile sottolineare che, a basse concentrazioni, ROS e RNS sono messaggeri intracellulari che esercitano una moltitudine di effetti biologici fondamentali, tra cui la difesa immunitaria e la trasmissione del segnale; per tale ragione non debbono essere inopinatamente contrastati con interventi esterni.

Per controllare i livelli di ROS e RNS, infatti, i tessuti possiedono molecole antiossidanti che lavorano in sinergia per ridurre al minimo la citotossicità dei radicali liberi. Composti endogeni antiossidanti non enzimatici sono, ad esempio, urato, bilirubina, glutazione, ubiquinolo (coenzima Q10), tioredoxina; anche alcune proteine, quali ferritina, transferrina, lattoferrina, ceruloplasmina, agiscono come antiossidanti in quanto sono capaci di legare e sequestrare metalli di transizione che, se in eccesso, potrebbero dare inizio a reazioni ossidative a catena come, ad esempio, accade nella reazione di Fenton (27).

Importanti enzimi antiossidanti endogeni sono la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPx), la glutazione reduttasi e S-transferasi, la catalasi, la tioredoxina reduttasi, la perossiredoxina (PRX) e la NAD(P)H/ubichinone ossidoriduttasi (NQO1). Recentemente, anche la famiglia delle paraoxonasi (PON) si è rivelata essere una classe di enzimi antiossidanti che gioca un ruolo importante in alcune malattie associate all'obesità, tra cui quelle cardiovascolari (CVD) e il diabete mellito (28, 29). In particolare, essendo presente sulla superficie delle lipoproteine ad alta densità (HDL), PON1 protegge le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le cellule circolanti contro i danni ossidativi, evitando così risposte infiammatorie nelle cellule della parete arteriosa.

Anche l'eme ossigenasi-1 (HO-1), enzima limitante nel metabolismo dell'eme, può essere considerato un enzima antiossidante in quanto in grado di ridurre lo stress ossidativo e inibire l'infiammazione. Recenti risultati indicano che HO-1 svolge un ruolo benefico nelle CVD, nella regolazione del peso corporeo, nel

metabolismo del diabete e nell'obesità (30-32).

Accanto alle componenti enzimatiche e non enzimatiche endogene, la barriera antiossidante si avvale anche del contributo degli antiossidanti alimentari, che comprendono in primo luogo le vitamine C ed E assieme a un ampio spettro di composti bioattivi. Zinco, manganese e selenio sono considerati nutrienti essenziali proprio in virtù dell'importanza che essi rivestono sull'attività degli enzimi antiossidanti: SOD utilizza infatti come cofattori manganese (Mn-SOD), rame e zinco (Cu-, Zn-SOD), mentre GPx1-4 e GPx6 contengono selenio.

Quando i livelli endogeni di ROS e RNS aumentano e/o la barriera antiossidante si riduce, l'equilibrio redox fisiologico si altera causando danneggiamenti ossidativi del DNA, dei lipidi e delle proteine, che possono evolvere in importanti alterazioni molecolari e strutturali fino alla morte cellulare (33).

Numerose osservazioni dimostrano che l'elevata deposizione di grassi è strettamente correlata a uno squilibrio redox. Sovrappeso e obesità in età giovanili sono stati collegati a elevati livelli di stress ossidativo (4, 5): soggetti obesi presentano livelli più elevati di LDL ossidate (oxLDL) e prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AAOP) rispetto ai soggetti di controllo (34). Negli adulti, BMI, grasso corporeo totale e circonferenza della vita sono positivamente correlati con i livelli di F2-isoprostani urinari (marcatori di danno ossidativo lipidico) e inversamente con l'attività PON1 (35-37). È interessante notare che il monitoraggio dei livelli di F2-isoprostani può far prevedere il mantenimento o la perdita di adiposità totale nel corso del tempo: una significativa associazione inversa tra F2-isoprostani urinari e aumento di peso nel corso di un periodo di controllo di 5 anni è stata infatti dimostrata sia dall'"Atherosclerosis Study" (38) che dall'"Health, Aging, and Body Composition Study" (39). Questa associazione inversa è stata interpretata come una risposta fisiologica positiva dell'organismo per contrastare l'eccesso di adiposità e/o una risposta catabolica all'infiammazione. Nei topi, l'obesità indotta dalla dieta aumenta lo stress ossidativo a livello cerebrale (40) e l'obesità indotta dalla dieta ad alto contenuto di grassi correla con una disfunzione mitocondriale e con un aumento dello stress ossidativo, tanto nel muscolo scheletrico quanto nel fegato (41). Cuori di roditori mantenuti in dieta ricca di grassi mostrano contemporaneamente elevate concentrazioni lipidiche, evidenze di ossidazione delle proteine e aumentati livelli dei marcatori di apoptosi (42).

Nonostante la forte associazione tra obesità e stress ossidativo, nessuno dei suddetti marcatori di danno ossidativo può essere considerato un predittore di sviluppo di obesità, mentre essi paiono in grado di predire lo sviluppo e la progressione di CVD e malattie metaboliche nelle persone in sovrappeso e obese (43).

È stata anche dimostrata una correlazione positiva tra marcatori di stress ossidativo e marcatori di infiammazione, iperglicemia e iperlipidemia. In soggetti giovani in sovrappeso e obesi, gli AOPP correlano

positivamente con obesità centrale, trigliceridemia e insulinemia, mentre correlano negativamente con il rapporto glucosio/insulina e il colesterolo HDL, suggerendo un aumento del rischio metabolico in questa popolazione (6, 7). Elevate concentrazioni di 8-idrossi-deossi-guanosina (8-OHdG), marcatore di danno ossidativo sul DNA, sono state inoltre dimostrate in soggetti prediabetici (44).

STRESS OSSIDATIVO NELLE MALATTIE CORRELATE ALL'OBESITÀ

Prove recenti hanno suggerito che lo stress ossidativo potrebbe essere il legame meccanicistico tra obesità e comorbidità, quali steatoepatite non alcolica, sindrome metabolica, diabete di tipo 2, CVD, apnea ostruttiva del sonno e alcuni tumori (45-47).

L'oncogenesi è certamente un fenomeno multifattoriale in cui lo squilibrio redox svolge un ruolo chiave. Studi epidemiologici hanno dimostrato una correlazione positiva tra aumento del rischio e peggiore prognosi del cancro, e BMI e distribuzione del grasso (48, 49). Sovrappeso e obesità sono responsabili del 14% delle morti per cancro negli uomini e del 20% nelle donne; la mortalità obesità-correlata è soprattutto osservata per i tumori della prostata e dello stomaco negli uomini, della mammella, endometrio, cervice, utero, ovaie nelle donne, e nei tumori gastrointestinali in entrambi i sessi (49). I principali determinanti coinvolti nella cancerogenesi e progressione del cancro sembrano essere il bilancio energetico, l'iperinsulinemia, lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica.

Prove convincenti indicano che livelli di stress ossidativo medio-alti causano danni al DNA che si traducono in instabilità genomica associata all'attivazione di oncogeni e/o all'inattivazione di geni oncosoppressori (24). L'alterata espressione genica può essere dovuta sia all'azione diretta del danno ossidativo sul DNA sia mediata da alterazioni epigenetiche; in particolare, i ROS hanno dimostrato di poter alterare il modello epigenetico con produzione di sostanze cancerogene che inducono ipermetilazione e/o provocando modificazioni degli istoni e l'espressione dei microRNA, favorendo l'oncogenesi e la progressione del cancro. La scoperta che i pazienti insulino-resistenti mostrano un elevato rischio per diversi tipi di tumore sostiene ulteriormente la teoria dello stretto legame tra stress ossidativo, infiammazione cronica e oncogenesi (24).

EQUILIBRIO REDOX, PERDITA DI PESO E ATTIVITÀ FISICA

Sono stati proposti diversi meccanismi di incremento nella generazione di ROS e RNS per spiegare il maggiore stress ossidativo nei soggetti obesi: alterazione dei livelli di lipidi e del metabolismo glucidico, infiammazione cronica (20), disfunzione tissutale (12),

iperleptinemia (19) e anormale produzione postprandiale di ROS (18). È suggestivo pensare che la restrizione calorica e il calo ponderale possano rappresentare un efficace mezzo per contrastarne l'iperproduzione. Tra gli effetti positivi della riduzione del peso in individui obesi, infatti, i più documentati sono la diminuzione del danno ossidativo e dell'infiammazione. La perdita di peso ottenuta tramite dieta ipocalorica influenza la produzione di ROS, come indicato da specifici marcatori di stress ossidativo e proteine coinvolte nei processi ossidativi mitocondriali correlati. Diversi studi dimostrano che la carbonilazione proteica, la perossidazione lipidica, le oxLDL e gli F2-isoprostani, così come marcatori infiammatori quali la proteina C-reattiva, l'interleuchina (IL) 8 e l'espressione di geni coinvolti nella cascata fattore di necrosi tumorale- α /fattore nucleare kappa B (TNF- α /NF- κ B), diminuiscono a seguito della riduzione del peso (50-54). Inoltre, le funzioni metaboliche migliorano con la riduzione dello stress ossidativo, come evidenziato da un aumento dei livelli di adiponectina e da una migliore funzionalità epatica (55).

STRESS OSSIDATIVO, OBESITÀ E MICROBIOTA

Grande interesse è stato recentemente rivolto dalla comunità scientifica alla caratterizzazione della flora microbica intestinale (microbiota) mediante il sequenziamento del suo genoma (microbioma), in quanto la sua composizione ha trovato spesso correlazione e importanti implicazioni in numerosi stati patologici, tra i quali l'obesità. Alcune osservazioni dimostrano, infatti, differenze quantitative e qualitative nel microbiota intestinale tra i soggetti ad alto e basso rischio di sviluppo di obesità e le complicanze a essa correlate, come insulino-resistenza e diabete di tipo 2 (56). Studi di trapianto di microbiota eseguiti sia negli animali che nell'uomo suggeriscono che il dismicrobismo intestinale può di per sé causare un aumento di peso e insulino-resistenza (57). I meccanismi ipotizzati sono maggiore efficienza di assorbimento di energia dal cibo, modificazione della permeabilità intestinale, rilascio di ormoni intestinali, induzione di stress ossidativo e infiammazione (58). La composizione microbica della flora intestinale è influenzata dal peso corporeo e da alcuni componenti della dieta, quali fibre, polifenoli e lipidi. I due *phylum* maggiormente rappresentati sono quello dei *Bacteroidetes* (50-60%) e dei *Firmicutes* (25-30%); mentre i batteri del primo gruppo si nutrono prevalentemente di fibre vegetali e sono in grado di assimilare pochi grassi della dieta, quelli del secondo si caratterizzano per la loro capacità di procurarsi nutrimento principalmente da grassi e zuccheri alimentari favorendone, al contempo, l'assorbimento da parte dell'organismo ospite. Nei soggetti obesi, la perdita di peso riduce il rapporto *Firmicutes*/*Bacteroidetes* (59), mentre una dieta ricca di grassi e il

carico calorico lo aumenta (60). Una relativamente elevata abbondanza di *Firmicutes* è associata a endotossemia metabolica a causa di un maggiore assorbimento di lipopolisaccaride (LPS), che raggiunge la circolazione e induce stress ossidativo, infiammazione e danni di segnalazione dell'insulina (56, 58). In realtà, alcuni studi riportano che i probiotici, microrganismi viventi, tra cui *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, e i prebiotici, componenti alimentari non vitali, tra cui gli "insulin-like" fruttani, conferiscono un beneficio per la salute che è associato alla modulazione del microbiota (58). Più volte prebiotici e probiotici sono stati dimostrati capaci di regolare il metabolismo dei soggetti obesi e dei disturbi correlati all'obesità (56, 58, 61, 62).

Uno studio condotto su roditori per individuare l'effetto di nuovi probiotici sulla sindrome metabolica (MS) indotta da dieta ricca in fruttosio sottolinea la capacità della flora intestinale di migliorare lo stress ossidativo. Gli animali che si nutrono con una dieta ricca di fruttosio sviluppano le caratteristiche cliniche della sindrome metabolica e presentano un aumento delle concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina, trigliceridi, colesterolo e livelli totali di marcatori dello stress ossidativo, così come della massa del fegato e dei lipidi rispetto ai controlli (63). Il trattamento probiotico abbassa quasi tutti questi parametri e riduce la lipogenesi. Altri studi sottolineano il ruolo positivo dei probiotici anche nella modulazione dello stato redox. Nei pazienti diabetici di tipo 2, il consumo di 300 g/giorno di yogurt probiotico contenente *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* migliora la glicemia e i parametri antiossidanti [capacità antiossidante totale (TAC), SOD e GPx] e decrementa l'ossidazione lipidica [malondialdeide (MDA)] (64).

I probiotici contrastano, inoltre, lo stress ossidativo indotto da esercizio fisico: il consumo giornaliero per 4 settimane di una miscela di due ceppi di probiotici, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, aumenta i livelli plasmatici della TAC e diminuisce i ROS (65). In soggetti sani, il consumo giornaliero per 3 settimane di 150 g di latte di capra fermentato con *Lactobacillus fermentum* aumenta la TAC e diminuisce i marcatori ossidativi nel sangue umano e nelle urine (oxLDL, F2-isoprostani e rapporto glutazione ossidato/ridotto) (66).

Interessanti osservazioni sono state fatte in merito alla relazione tra alcuni antiossidanti alimentari, i polifenoli in particolare, e microbiota. La composizione della flora microbica intestinale, infatti, sembra in grado di agire direttamente sulla bioattività di sostanze come i polifenoli, che sono componenti presenti normalmente nella dieta, noti per il loro effetto antiossidante *in vitro*, ma anche per la loro bassa biodisponibilità *in vivo*. La presenza o meno di microbi in grado di metabolizzare i polifenoli potrebbe, almeno in parte, spiegare la variabilità inter-individuale degli effetti benefici sulla salute osservati a seguito dell'integrazione alimentare con polifenoli. Poiché allo stesso tempo, i polifenoli, cambiando lo stato redox intestinale, sono in grado di controllare le sotto-popolazioni del microbiota, si può

ben ritenere che l'interconnessione microbiota-polifenoli possa rappresentare un nuovo obiettivo per gli studi sull'obesità e sulle altre patologie mediate da stress ossidativo (67).

STRESS OSSIDATIVO E LABORATORIO CLINICO

Il laboratorio clinico, oltre all'indiscussa capacità di descrivere in dettaglio il quadro fisiopatologico molecolare dell'obesità (68-70), riveste un ruolo fondamentale anche negli studi sullo stress ossidativo (Tabella 1). Infatti, questi si fondano principalmente su analisi volte a valutare l'entità del potenziale ossidante nei fluidi corporei, plasma e urine principalmente, l'efficacia dei meccanismi di contrasto e l'evidenza di alterazioni molecolari conseguenti a un eventuale sbilanciamento tra essi.

L'analisi diretta dei radicali liberi ROS e RNS è resa particolarmente difficile dalla loro elevata reattività e breve emivita e si avvale di tecniche quali la spettroscopia di risonanza di spin dell'elettrone (ESR) e i metodi di "spin-trap", che, pur rappresentando il "gold standard", sono solo raramente disponibili (71, 72). Abbastanza frequente è, perciò, il ricorso alla misurazione dei radicali liberi mediante determinazione indiretta degli idroperossidi plasmatici che si formano per azione dei ROS (73).

Più composito è il pannello degli analiti che concorrono a formare la barriera antiossidante: ne fanno parte, infatti, numerose classi molecolari, talune ad attività enzimatica e altre ad azione antiossidante non enzimatica (Tabella 1). Tra queste ultime si distinguono due classi di antiossidanti: quelli endogeni, fisiologicamente presenti, come glutazione, coenzima Q10, acido urico, bilirubina, melatonina, tioredoxina, e quelli esogeni introdotti con la dieta come le vitamine A, E, K, C, l'acido lipoico, i polifenoli e i flavonoidi (74).

Oltre ai vari metodi proposti per valutare, mediante analisi spettrofotometriche, la capacità antiossidante ematica nella sua totalità (75-77), numerosi metodi cromatografici consentono di analizzare singolarmente molte tra le principali componenti della barriera. Per alcuni analiti, come glutazione e coenzima Q10, sono stati proposti anche metodi che permettono di misurare contemporaneamente tanto la frazione ossidata quanto quella ridotta e, in base al loro rapporto, valutare la presenza di uno sbilanciamento ossido-riduttivo rispetto all'equilibrio fisiologico (78, 79).

A causa della varietà dei componenti della barriera antiossidante è però spesso necessario ricorrere alla determinazione di più marcatori per descrivere un quadro sufficientemente ampio, ancorché incompleto. Recentemente, nell'ottica di superare questa necessità, sono stati fatti tentativi di valutazione dinamica dell'intero complesso enzimatico antiossidante mediante analisi proteomica quantitativa (80).

Forse ancora più utile della valutazione del rapporto tra potere ossidante e antiossidante nei liquidi corporei è l'individuazione e la determinazione dei marcatori di

Tabella 1

Principali marcatori misurabili per la valutazione dello stress ossidativo nell'obesità e rispettive tecniche di analisi

<i>Potenziale ossidante</i>		
Analisi diretta dei radicali liberi ROS e RNS		Spettroscopia di risonanza di spin dell'elettrone e spin-trap
Analisi indiretta di ROS (idroperossidi plasmatici)		Spettrofotometria
<i>Barriera antiossidante enzimatica</i>		
Catalasi		Cinetica enzimatica
Superossidodismutasi (SOD)		Cinetica enzimatica, ELISA
Perossiredoxina		Cinetica enzimatica, ELISA
Glutazione perossidasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Glutazione reduttasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Glutazione S-transferasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Tioredoxina redattasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Eme-ossigenasi 1		Cinetica enzimatica, ELISA
NADPH-ubichinone ossidoriduttasi		Cinetica enzimatica, ELISA
Paraoxonasi		Cinetica enzimatica, ELISA
<i>Barriera antiossidante non enzimatica</i>		
Endogeni	Glutazione	Spettrofotometria, ELISA, HPLC
	Coenzima Q10	ELISA, HPLC
	Acido urico	Spettrofotometria
	Bilirubina	Spettrofotometria
	Tioredoxina	ELISA, HPLC
	Ferritina	Immunochimica
	Transferrina	Immunochimica
	Lattoferrina	ELISA
	Ceruloplasmina	Spettrofotometria, ELISA
	Melatonina	HPLC
Esogeni	Vitamina A	HPLC
	Vitamina E	HPLC
	Vitamina K	HPLC
	Vitamina C	HPLC
	Acido lipoico	HPLC
	Polifenoli	HPLC
	Flavonoidi	HPLC
	Oligoelementi: zinco, manganese, selenio	Fotometria, assorbimento atomico
Analisi del potenziale antiossidante plasmatico totale		Spettrofotometria

ROS, specie reattive dell'ossigeno; RNS, specie reattive dell'azoto.

danno. L'eccessiva produzione di ROS e RNS non contrastata da un'efficace barriera antiossidante, infatti, può essere causa di alterazioni molecolari ossidative a carico di tutte le classi di macromolecole biologiche, con conseguenti inevitabili effetti a livello di funzioni cellulari, organi e tessuti.

Il processo di ossidazione delle proteine comporta,

ad esempio, l'introduzione di nuovi gruppi funzionali che possono contribuire ad alterarne funzione e metabolismo. Principali marcatori di ossidazione delle proteine sono i gruppi carbonilici, i prodotti di ossidazione della tirosina (ad es., la 3-nitrotirosina), gli idroperossidi e perossidi proteici di valina, leucina, lisina, la chinurenina, la metionina-sulfossido e

metionina-sulfone e i disolfuri della cisteina (74). Anche i prodotti di glicazione avanzata delle proteine (AGE) e gli AOPP sono stati più volte proposti come oggetto di studio nella valutazione del danno ossidativo nel comparto proteico (81).

L'attacco dei ROS, in particolare del radicale idrossile, sugli acidi nucleici può anche essere causa di mutazioni attraverso la modificazione di specifiche basi azotate e rottura della doppia elica del DNA. Il marcatore di danno ossidativo più spesso utilizzato a tale riguardo è la 8-idrossi-deossiguanosina (8-OHdG) (82), ma anche altri analiti sono stati proposti per il loro probabile maggiore contenuto informativo, come ad esempio la 8-idrossi-guanina (8-OH-Gua) (83).

Di evidente interesse negli studi sull'obesità sono le alterazioni ossidative a carico dei lipidi. I fosfolipidi di membrana e i trigliceridi contenuti nelle LDL sono, infatti, molecole particolarmente suscettibili all'attacco radicalico. Gli idroperossidi lipidici, che originano dalla prima reazione ossidativa che determina un riarrangiamento molecolare a livello dei doppi legami, sono a loro volta specie reattive che innescano una reazione a catena la quale porta alla formazione di perossidi ciclici e ad aldeidi α - β insature, come la malondialdeide (MDA) e la 4-idrossi-nonenale (4-HNE); queste ultime, accanto alle oxLDL e alle specie reattive all'acido tiobarbiturico (TBARs), sono frequentemente studiate come marcatori di ossidazione lipidica (84, 85). Da ultimo, è necessario osservare che una particolare classe di composti generati dalla lipoperossidazione dell'acido arachidonico, gli F2-isoprostani, per effetto della loro stabilità e indipendenza dalla dieta, sono stati proposti come miglior marcatore di ossidazione lipidica. Tuttavia, poiché la loro determinazione è considerata affidabile solo se condotta mediante cromatografia liquida associata a spettrometria di massa, il loro impiego diagnostico risulta attualmente problematico (86, 87).

CONCLUSIONI

Tra le molteplici ipotesi formulate sull'eziopatologia dell'obesità, è suggestivo pensare che un ruolo chiave possa essere attribuito alla relazione tra stress ossidativo e microbiota intestinale. Molteplici evidenze tendono a dimostrare che fattori genetici, epigenetici e stile di vita concorrono a determinare nell'obeso uno sbilanciamento dell'equilibrio redox correlato con l'alterazione della flora microbica intestinale. Interventi medici volti non solo a modificare l'apporto calorico, ma anche a modulare e migliorare la composizione della dieta con l'obiettivo di riequilibrare l'asse microbiota-stato redox appaiono perciò, ancor più che in passato, strumenti promettenti nella terapia dell'obesità. E' pertanto auspicabile che, mediante analisi biochimiche e genetiche mirate alla descrizione dei marcatori di stress ossidativo e alla caratterizzazione del microbiota, il laboratorio clinico possa svolgere presto un ruolo importante.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. World Health Organization fact sheet for world wide prevalence of obesity. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
2. Nishida C, Ko, GT, Kumanyika S. Body fat distribution and non communicable diseases in populations: overview of the 2008 WHO expert consultation on waist circumference and waist-hip ratio. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:2-5.
3. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117-32.
4. Warolin J, Coenen KR, Kantor JL, et al. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy black and white American youth. *Pediatr Obes* 2014;9:43-52.
5. Tran B, Oliver S, Rosa J, et al. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:683680.
6. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, et al. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008;41:943-9.
7. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso, S, Murria-Estal R, et al. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:237-43.
8. Hermsdorff HH, Barbosa KB, Volp AC, et al. Gender-specific relationships between plasma oxidized low-density lipoprotein cholesterol, total antioxidant capacity, and central adiposity indicators. *Eur J Prev Cardiol* 2014;21:884-91.
9. Karaouzene N, Merzouk H, Aribi M, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:792-9.
10. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:969-72.
11. Dandona P, Ghanim H, Chaudhuri A, et al. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: Potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Exp Mol Med* 2010;42:245-53.
12. Serra D, Mera P, Malandrino MI, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:269-84.
13. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
14. Lee H, Lee YJ, Choi H, et al. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 2009;284:10601-9.
15. Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev* 2013;22:878-88.
16. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:78-87.
17. Mlinar B, Marc J. New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1925-35.
18. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, et al. Prolonged

- reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4476–9.
19. Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:168–78.
 20. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701–11.
 21. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:590–7.
 22. Strauss RS. Comparison of serum concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). *J Pediatr* 1999;134:160–5.
 23. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, et al. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111:1448–54.
 24. Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res* 2013;47:243–56.
 25. Tzanetakou IP, Katsilambros NL, Benetos A, et al. Is obesity linked to aging? Adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Res Rev* 2012;11:220–9.
 26. Bigornia SJ, Mott MM, Hess DT, et al. Long-term successful weight loss improves vascular endothelial function in severely obese individuals. *Obesity* 2010;18:754–9.
 27. Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, et al. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E77–86.
 28. Abelló D, Sancho E, Camps J. Exploring the role of paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease: a systematic review. *Int J Mol Sci* 2014;15:20997–1010.
 29. Li YR, Zhu H, Kauffmann M, et al. Paraoxonases function as unique protectors against cardiovascular diseases and diabetes: updated experimental and clinical data. *Exp Biol Med* (Maywood) 2014;239:899–906.
 30. Chan KH, Ng MK, Stocker R. Haem oxygenase-1 and cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci* 2011;120:493–504.
 31. Abraham NG, Junge JM, Drummonds GS. Translational significance of heme oxygenase in obesity and metabolic syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:17–36.
 32. Negi G, Nakkina V, Kamble P, et al. Heme oxygenase-1, a novel target for the treatment of diabetic complications: focus on diabetic peripheral neuropathy. *Pharmacol Res* 2015;102:158–67.
 33. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012;70:257–65.
 34. D'Archivio M, Annuzzi G, Vari R, et al. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur J Clin Invest* 2012;42:70–8.
 35. Keane JF Jr, Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434–9.
 36. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, et al. HDL-paraoxonase and membrane lipid peroxidation: a comparison between healthy and obese subjects. *Obesity* 2010;18:1079–84.
 37. Aslan M, Horoz M, Sabuncu T, et al. Serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress in obese subjects. *Pol Arch Med Wewn* 2011;121:181–6.
 38. Il'yasova D, Wang F, Spasojevic I, et al. Urinary F2-isoprostanes, obesity, and weight gain in the IRAS cohort. *Obesity* 2012;20:1915–21.
 39. Kanaya AM, Wassel CL, Stoddard PJ, et al. F2-isoprostanes and adiposity in older adults. *Obesity* 2011;19:861–7.
 40. Freeman LR, Zhang L, Nair A, et al. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med* 2013;56:226–33.
 41. Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. *PLoS One* 2013;8:e54059.
 42. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 2012;197:857–67.
 43. Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N, et al. Oxidative stress drivers and modulators in obesity and cardiovascular disease: from biomarkers to therapeutic approach. *Curr Med Chem* 2015;22:582–95.
 44. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2011;164:899–904.
 45. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61.
 46. Rahimi RS, Landaverde C. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: clinical implications and treatment. *Nutr Clin Pract* 2013;28:40–51.
 47. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:378–400.
 48. Fujihara S, Mori H, Kobara H, et al. Metabolic syndrome, obesity, and gastrointestinal cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:483623.
 49. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38.
 50. Solá E, Navarro S, Medina P, et al. Activated protein C levels in obesity and weight loss influence. *Thromb Res* 2009;123: 697–700.
 51. Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *Omics* 2008;12:251–61.
 52. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, et al. Tachyphylaxis effects on postprandial oxidative stress and mitochondrial-related gene expression in overweight subjects after a period of energy restriction. *Eur J Nutr* 2009;48:341–7.
 53. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:355–62.
 54. Kuennen MR. Interaction between race and weight loss intervention strategy: effect on markers of inflammation and fat distribution in overweight women. *Obesity* 2012;20:1335–6.
 55. You JS, Park JY, Zhao X, et al. Relationship among serum taurine, serum adipokines, and body composition during 8-week human body weight control program. *Adv Exp*

- Med Biol 2013;776:113–20.
56. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013;34:39–58.
 57. Vrieze A, van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913–6.
 58. Diamant M, Blaak EE, de Vos WM. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obes Rev* 2011;12: 272–81.
 59. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022–3.
 60. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:58–65.
 61. Arora T, Singh S, Sharma RK. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition* 2013;29:591–6.
 62. Park DY, Ahn YT, Huh CS, et al. Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 2013;19:274–83.
 63. Toop C, Gentili S. Fructose beverage consumption induces a metabolic syndrome phenotype in the rat: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2016;8:E577.
 64. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 2012;28:539–43.
 65. Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, et al. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr Microbiol* 2011;62:1689–96.
 66. Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br J Nutr* 2003;90:449–56.
 67. Bolca S, van de Wiele T, Possemiers S. Gut metabolites govern health effects of dietary polyphenols. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:220–5.
 68. Di Francesco V, Antonioli A, Fantin F, et al. Nel soggetto anziano il contenuto di grassi del pasto influenza il profilo degli ormoni e il senso di fame postprandiali. *Biochim Clin* 2010;34:331–6.
 69. Zoico E, Rossi A, Zamboni M. Adipocitochine e complicanze metaboliche dell'obesità. *Biochim Clin* 2010;35:10–9.
 70. Tozzoli R. Il tessuto adiposo come organo endocrino: ruolo della diagnostica di laboratorio nell'obesità e nella sindrome metabolica. *RIMeL/IJLaM* 2010;6(suppl):18–23.
 71. Lee MC. Assessment of oxidative stress and antioxidant property using electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *J Clin Biochem Nutr* 2013;52:1–8.
 72. Khoo NK, Cantu-Medellin N, Devlin JE, et al. Obesity-induced tissue free radical generation: an in vivo immunospin trapping study. *Free Radic Biol Med* 2012;52:2312–9.
 73. Gletsu-Miller N, Hansen JM, Jones DP, et al. Loss of total and visceral adipose tissue mass predicts decreases in oxidative stress after weight loss surgery. *Obesity* 2009;17:439–46.
 74. Franzini M, Fornaciari I, Fierabracci V. Indici di laboratorio di stress ossidativo. *Ligand Assay* 2009;14:41–50.
 75. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998;44:1309–15.
 76. Lorgis L, Zeller M, Dentan G, et al. The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2010;213:616–21.
 77. Pavlatou MG, Papastamataki M, Apostolakou F, et al. FORT and FORD: two simple and rapid assays in the evaluation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab Clin Exper* 2009;58:1657–62.
 78. Tang PH, Miles MV, De Grauw A, et al. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma. *Clin Chem* 2001;47:256–65.
 79. Serru V, Baudin B, Ziegler F, et al. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2001;47:1321–4.
 80. Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI, et al. High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. *J Biol Chem* 2013;288:1979–90.
 81. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Wysz-Szczotka K, et al. Plasma biomarkers of oxidative and AGE-mediated damage of proteins and glycosaminoglycans during healthy ageing: a possible association with ECM metabolism. *Mech Ageing Dev* 2012;133:538–48.
 82. Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 2000;72:1082–7.
 83. Li YS, Song MF, Kasai H, et al. 8-hydroxyguanine in urine and serum as an oxidative stress marker: effects of diabetes and aging. *J UOEH* 2013;35:119–27.
 84. McGrath LT, McGleenon, Brennan S, et al. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *Q J Med* 2001;94:485–90.
 85. Parra D, Bandarra NM, Kiely M, et al. Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity. *Eur J Nutr* 2007;46:460–7.
 86. Wiswedel I, Peter D, Gardemann A, et al. Serum concentrations of F2-isoprostanes and 4-hydroxynonenal in hemodialysis patients in relation to inflammation and renal anemia. *Biomark Insights* 2008;3:419–28.
 87. Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M, et al. Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy* 2015;66:393–405.

Anemia acquisita da ospedalizzazione: il ruolo delle perdite di sangue a scopo diagnostico

Elena Aloisio^{1,2}, Sara Pasqualetti¹, Alberto Dolci¹, Mauro Panteghini^{1,2}

¹UOC Patologia Clinica, Ospedale 'Luigi Sacco', ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano

²Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Hospital-acquired anemia: the role of diagnostic blood loss. Hospital-acquired anemia (HAA) is defined by a reduction of blood hemoglobin concentrations in hospitalized patients, in absence of bleeding episodes occurring during the hospital stay. One of the most important causes of HAA is the considerable amount of blood drawn for diagnostic purposes, which mainly affects critical patients in the intensive care units. Although usually underestimated by healthcare providers, HAA can be a significant problem, because it may increase the necessity of allogenic transfusions, the morbidity and mortality rates and healthcare costs. Strategies to minimize diagnostic blood loss should be implemented by both clinical wards and laboratories within wider patient blood management programs, with the aim of improving patient clinical outcome. These should include using small-volume test tubes, reduction of sample waste, optimization of testing frequency, early removal of central catheters and healthcare professional education.

INTRODUZIONE

L'anemia acquisita da ospedalizzazione (HAA), nota anche come anemia iatrogena o nosocomiale, è un'anemia che si sviluppa come conseguenza diretta del ricovero ospedaliero. HAA ha generalmente un'origine multifattoriale, ma uno degli elementi che contribuiscono maggiormente al suo sviluppo è la quantità di sangue prelevata ai pazienti per l'esecuzione di esami di laboratorio durante il ricovero (1). Si tratta di un problema tutt'altro che trascurabile visto che la prevalenza di HAA nei pazienti ospedalizzati può superare il 70%, determinando aumenti consistenti della morbilità e della mortalità intraospedaliera, dovuti in parte anche all'aumentata probabilità per questi pazienti di andare incontro a trasfusioni di sangue o derivati (2). Nell'ottica di ridurre al minimo i rischi, spesso sottostimati, associati alle trasfusioni, l'OMS ha rilasciato nel 2002 un manuale in cui viene descritto come, attraverso l'utilizzo clinico appropriato del sangue, il numero di trasfusioni non strettamente necessarie può essere diminuito globalmente, senza compromettere gli standard di qualità e la sicurezza dei pazienti (3). Inoltre, la 63^a Assemblea Mondiale della Sanità ha varato nel 2010 una risoluzione (4) in cui, tra le altre cose, si richiedeva al Direttore Generale dell'OMS di supportare l'introduzione

nelle strutture ospedaliere di strategie per l'ottimizzazione della gestione del sangue dei pazienti ("patient blood management"), da considerarsi come una risorsa unica e preziosa da preservare a tutti i costi, evitandone consumi non necessari (5).

Al fine di ridurre l'impatto che l'esecuzione degli esami di laboratorio può avere sul rischio di sviluppare HAA, possono essere adottate diverse strategie che permettono di ridurre la quantità di sangue necessaria per le analisi, come ad esempio il passaggio all'utilizzo di provette a volume ridotto e a strumentazioni che richiedano volumi analitici più piccoli e l'organizzazione di programmi formativi e di monitoraggio dell'appropriatezza delle richieste (6, 7).

DEFINIZIONE DI HAA

I livelli decisionali per la concentrazione di emoglobina (Hb) stabiliti dall'OMS per la diagnosi di anemia sono <130 g/L per i maschi e <120 g/L per le femmine in età adulta (8). L'anemia può inoltre essere classificata come lieve (Hb maschi: 110-129 g/L, Hb femmine: 110-119 g/L), moderata (Hb: 80-109 g/L) o severa (Hb: <80 g/L) (8).

Pur non esistendo una definizione ufficialmente

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

Ricevuto: 22.11.2016

Revisionato: 26.01.2017

Accettato: 28.02.2017

Publicato on-line: 13.07.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.027

riconosciuta, HHA viene generalmente intesa come una riduzione della concentrazione ematica di Hb durante la degenza ospedaliera fino a valori patologici, partendo da valori fisiologici all'ammissione in ospedale e in assenza di eventi emorragici evidenti durante il ricovero (9). Questa definizione comporta che possa essere considerato causa di HAA qualsiasi atto medico a cui vanno incontro i pazienti ospedalizzati: dai prelievi di sangue a scopo diagnostico, alla somministrazione di fluidi endovena e all'allettamento.

L'esordio dell'HAA, come quello di tutte le anemie, può essere insidioso. Nonostante il fatto che, generalmente, i pazienti ricoverati sono strettamente monitorati e quindi i valori di Hb ben documentati, abbassamenti di tipo iatrogeno spesso si manifestano clinicamente solo dopo parecchi giorni e i sintomi, se presenti, sono vaghi, aspecifici e lentamente progressivi: pallore, affaticamento, malessere, astenia, dispnea, cefalea, tachicardia e vertigini. Per questo motivo, in alcuni casi, l'abbassamento incrementale delle concentrazioni di Hb e i sintomi associati non vengono considerati clinicamente significativi fino a che non vengono raggiunte condizioni critiche tali da richiedere una trasfusione (10).

Il corpo umano contiene ~5 L di sangue, composto da elementi corpuscolati e plasma. Le cellule del sangue generalmente si rinnovano autonomamente e perdite fino al 30% del volume totale sono spesso tollerate senza necessità di compensazione esogena (1). L'anemia insorge infatti quando esiste una discrepanza tra la quantità di eritrociti persi, indipendentemente dal motivo, e la quantità che il corpo è in grado di rigenerare in un dato periodo di tempo. Malfunzionamenti di uno qualsiasi dei processi che definiscono il "turnover" fisiologico dei globuli rossi possono portare a sviluppo di patologia (11) e in un paziente ospedalizzato, solitamente affetto da un numero variabile di comorbidità, le cause di un'anemia possono essere molteplici, in parte organiche e in parte iatrogene, e difficilmente distinguibili una dall'altra.

FATTORI DI RISCHIO

Per quanto tutti i pazienti ricoverati siano a rischio di sviluppare HAA, essa colpisce prevalentemente i malati critici dei reparti di terapia intensiva, nei quali è stato osservato che le concentrazioni ematiche di Hb tendono nel tempo a convergere verso valori bassi, indipendentemente dall'età, dalle comorbidità e dai valori rilevati all'ammissione (12-14), e i pazienti pediatrici, soprattutto se ricoverati nelle unità di patologia neonatale (15).

In condizioni fisiologiche, l'eritropoietina (EPO) endogena, prodotta nel rene, stimola il midollo osseo a produrre eritrociti. Tuttavia, i neonati hanno fisiologicamente un'eritropoiesi ridotta durante le prime settimane post-parto (16), mentre nei pazienti critici i livelli di EPO circolanti sono spesso diminuiti a causa della ridotta funzionalità renale e dell'inibizione della produzione dell'ormone da parte delle citochine pro-

infiammatorie (Figura 1) (17). Inoltre, la risposta del midollo all'EPO può essere diminuita a causa di una "down-regulation" dei suoi recettori. Questa insufficienza midollare viene spesso ulteriormente esacerbata da molti dei farmaci utilizzati nelle terapie intensive, quali inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, sartani, β -bloccanti, teofilline, calcio antagonisti e alcuni antibiotici, e da deficit nutrizionali di ferro, folati e vitamina B₁₂ (11, 18). Pertanto, i pazienti in condizioni critiche non sono in grado di tollerare perdite di sangue che, in pazienti meno compromessi, non porterebbero ad alcuna significativa conseguenza patologica. Inoltre, in questi pazienti, anche l'emodiluizione provocata dalla somministrazione di fluidi endovena o dal prolungato allettamento, la gravità della patologia di base, la durata del periodo di ospedalizzazione e l'età possono contribuire allo sviluppo e all'aggravamento dell'HAA (2, 9, 19).

PERDITE DI SANGUE A SCOPO DIAGNOSTICO

Nel 1973, Eyster e Bernene osservarono che i pazienti ammessi nelle unità coronarica e pneumologica del New York Hospital sviluppavano durante la degenza reticolocitosi e anemia di grado moderato, in assenza di cause evidenti (20). Gli autori evidenziarono che proprio i prelievi di sangue eseguiti a scopo diagnostico contribuivano in gran parte allo sviluppo di tale condizione. Da allora, sono stati pubblicati numerosi lavori che riportano come ai pazienti ospedalizzati siano spesso sottratte ingenti quantità di sangue per l'esecuzione di indagini di laboratorio (Tabella 1) (9, 12, 14, 20-38). Nonostante siano i più suscettibili all'anemizzazione e a tutti i rischi da essa derivati, generalmente sono proprio i pazienti critici coloro ai quali vengono sottratte le maggiori quantità di sangue e spesso i medici non sono consapevoli, o comunque lo sono solo in parte, dell'associazione che esiste tra volume di sangue prelevato, anemizzazione, aumento di morbilità e mortalità intraospedaliera e incrementi nel consumo delle risorse, con lievitazioni importanti dei costi sanitari (38). Purtroppo, gli studi riportati nella

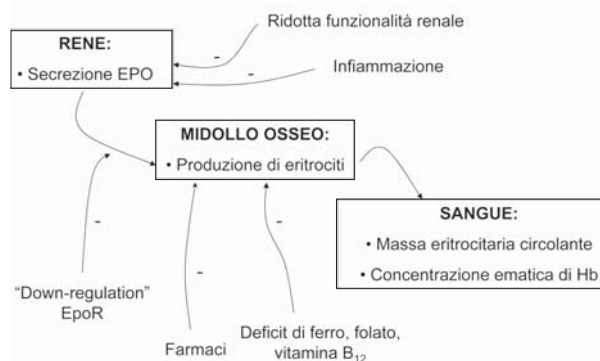


Figura 1

Fattori influenzanti l'eritropoiesi nei pazienti critici.

EPO, eritropoietina; EpoR, recettori per l'EPO; Hb, emoglobina.

Tabella 1

Studi riportanti la quantità di sangue prelevata a pazienti adulti ospedalizzati, giornalmente o durante l'intero ricovero

Riferimento bibliografico (anno)	Unità di degenza (caratteristiche dei pazienti)	n	Volume prelevato/die (mL)	Volume totale prelevato durante la degenza (mL)
20 (1972)	Pneumologia e unità coronarica	93	54±17 ^a	-
21 (1976)	Terapia intensiva post-chirurgica	20	147-478 ^b	-
22 (1986)	Medicina interna	50	12 ^a	175 ^a
	Terapia intensiva	50	42 ^a	726 ^a
	Terapia intensiva (portatori di catetere arterioso)	31	46 ^a	944 ^a
	Terapia intensiva (non portatori di catetere arterioso)	19	23 ^a	301 ^a
23 (1989)	Terapia intensiva	81	63±4 ^a	250±29 ^a
24 (1989)	Terapia intensiva	15	56 ^a	226 ^a
25 (1990)	Terapia intensiva	26	66 ^a	336 ^a
26 (1993)	Terapia intensiva	14	-	550 ^a
	Medicina interna	99	-	208 ^a
27 (1993)	Terapia intensiva	31	-	257±111 ^a
28 (1995)	Terapia intensiva	142	40-70 ^b	-
29 (1995)	Terapia intensiva (portatori di catetere arterioso)	25	-	115±54 ^a
	Terapia intensiva (non portatori di catetere arterioso)	25	-	64±28 ^a
12 (2002)	Terapia intensiva	1136	41±40 ^a	-
30 (2003)	Terapia intensiva	91	40±15 ^a	-
31 (2003)	Terapia intensiva	277	13-40 ^b	29-144 ^b
32 (2004)	Medicina interna	404	-	75±52 ^a
14 (2006)	Terapia intensiva	155	13±7 ^a	-
33 (2007)	Terapia intensiva (in ventilazione invasiva)	43	16 ^a	245 ^a
34 (2008)	Terapia intensiva	ND	-	20 (12-36) ^c
35 (2009)	Terapia intensiva	124	23±10 ^a	100±67 ^a
36 (2009)	Nefrologia (acuti)	70	-	216±166 ^a
9 (2011)	Unità coronarica (infarto acuto del miocardio)	3551	-	173±139 ^a
37 (2015)	Terapia intensiva	ND	40 ^a	140 ^a
38 (2015)	Terapia intensiva cardiovascolare	1766	-	332 (197-619) ^c
	Cardiochirurgia	1921	-	118 (73-232) ^c

ND, non disponibile.

^aMedia (±DS, quando disponibile).

^bIntervallo.

^cMediana (25°-75° frattile).

Tabella 1 sono piuttosto disomogenei tra loro e molti anche parecchio datati, per cui risulta difficile delineare un quadro univoco della situazione attuale. Nonostante ciò, è evidente che, in pazienti in condizioni tutt'altro che ottimali, rimozioni di quantità di sangue che possono superare i 70 mL/die sono troppo elevate rispetto alla capacità effettiva di compensazione autonoma e

possono provocare significative perdite di ferro che portano conseguentemente a gravi carenze e ulteriore peggioramento dell'anemia, tenendo anche in considerazione che spesso questi pazienti non si alimentano autonomamente e quindi hanno introiti dietetici di ferro e vitamine molto ridotti (10).

In uno dei lavori più recenti, è stato stimato che, per

ogni 50 mL di sangue prelevato, il rischio di sviluppare HAA moderata o severa aumenta del 18% (9). Inoltre, altri autori hanno rilevato che, sul lungo periodo (dopo 21 giorni di ricovero), incrementi anche piccoli nel volume medio prelevato giornalmente sono associati ad aumenti significativi del rischio di trasfusione [“odds ratio” per ogni mL/die prelevato incrementalmente: 1,22, 95% intervallo di confidenza (CI): 1,11-1,34]. In altre parole, per quantità di sangue prelevate in media giornalmente di 3,5 mL/die (95% CI: 2,4-6,8), il rischio di trasfusione dopo 21 giorni di ricovero raddoppiava (14).

Nel 2012, Lyon et al. hanno sviluppato un modello matematico che permette di simulare le riduzioni delle concentrazioni di Hb nel tempo in pazienti sottoposti a prelievi ripetuti (39). Questo modello potrebbe facilmente essere adattato per predire l'insorgenza di anemia iatrogena nei pazienti critici, impostando il tasso di sintesi di Hb pari a zero, dato che, come riportato in precedenza, questi pazienti hanno spesso insufficienza midollare e alterata eritropoiesi (15).

Per quanto riguarda i pazienti pediatrici, il problema è probabilmente ancora più rilevante, anche se generalmente meno ignorato (15). In un neonato prematuro, un prelievo di 1 mL di sangue rappresenta facilmente più del 1% della volemia ed è quindi facile capire come la quantità di sangue sottratta per l'esecuzione degli esami ematochimici sia uno dei principali fattori che singolarmente contribuiscono all'insorgenza o all'aggravamento dell'anemia in questi pazienti (40). Nonostante questo, studi riportano che il volume medio prelevato ai neonati ricoverati varia tra 1,1 e 3,5 mL/kg/die e non è improbabile che, a volte, le perdite totali di sangue a scopo diagnostico durante la prima settimana di vita, eguagliano o superino addirittura il volume totale di sangue circolante (41).

IL “PATIENT BLOOD MANAGEMENT”

È stimato che più di un terzo dei pazienti in terapia intensiva venga sottoposto durante la degenza a trasfusioni di una o più unità di eritrociti concentrati e questa frazione può aumentare fino a oltre il 60% nei pazienti ricoverati per più di una settimana (42). Negli ultimi anni, tuttavia, è diventato evidente che le trasfusioni non possono essere la soluzione elettiva per risolvere il problema dell'HAA. Infatti, una trasfusione può arrivare a incrementare morbilità e mortalità a 30 giorni dei pazienti del 40% e la mortalità a 6 mesi del 67% (42). Il sangue allogenico deve essere considerato come una risorsa da utilizzare in maniera oculata e responsabile, e solamente dopo un'accurata valutazione delle alternative disponibili e del rapporto rischio-beneficio (1, 5).

In un'ottica di questo tipo, si inserisce il concetto relativamente recente di “patient blood management” (PBM), che combina diverse strategie con lo scopo ultimo di migliorare la prognosi del paziente, prevenendo o comunque minimizzando il rischio di sviluppo di anemia e, nel caso ciò non fosse possibile, migliorandone la gestione, in modo da evitare la

progressione verso stadi severi e, quindi, verso inevitabili trasfusioni (5, 43, 44). Il PBM, che non si pone solamente l'obiettivo di prevenire HAA, ma qualsiasi forma di anemia, si basa sull'applicazione e l'osservanza di tre pilastri fondamentali, illustrati in Figura 2 (5). In seguito all'interessamento da parte dell'OMS (3, 4), molti ospedali in tutto il mondo hanno acquisito il concetto di PBM adeguando con successo le strategie preesistenti per l'ottimizzazione della cura. Tuttavia, l'idea della gestione del sangue del paziente non è ancora diffusa quanto dovrebbe e quanto sarebbe auspicabile. I protocolli di PBM necessitano di un approccio multidisciplinare e multiprofessionale complesso, che veda coinvolti sia il personale clinico, medico e infermieristico, che il laboratorio (1, 45). Ciascuna categoria professionale può contribuire, infatti, alla prevenzione dell'HAA adottando diverse strategie. In particolare, per quanto riguarda la gestione della quantità di sangue sottratta ai pazienti a scopo diagnostico, è possibile intervenire sui due macroproblemi, che maggiormente vi contribuiscono: da un lato l'elevata frequenza con cui vengono richiesti gli esami di laboratorio negli stessi pazienti e dall'altro le quantità di sangue prelevate per ciascun esame, che spesso risultano essere molto maggiori del necessario (46).

Frequenza di richiesta di nuovi esami

È noto che esiste un'enorme variabilità tra medico e medico per quanto riguarda il comportamento nel richiedere gli esami ematochimici. Ciò fa pensare che una parte di questi vengano eseguiti in assenza di reali necessità cliniche e di protocolli condivisi (47). Queste differenze dipendono da molti fattori, tra i quali l'incapacità dei medici di stimare correttamente le caratteristiche di variabilità biologica dei singoli analiti, un'interpretazione inadeguata dei risultati e i rapidi sviluppi non solo delle tecnologie analitiche, ma anche nella ricerca e introduzione di nuovi biomarcatori che

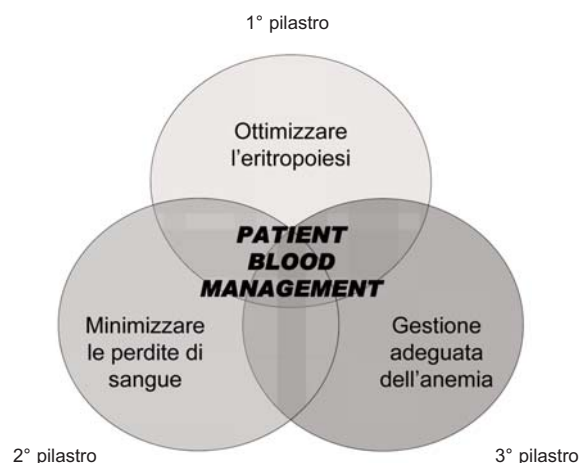


Figura 2
I tre pilastri del “patient blood management” secondo Ibister (5).

rendono difficile per i clinici restare aggiornati e scegliere consapevolmente, tra i tanti disponibili, l'esame più appropriato e clinicamente efficace (48, 49). Inoltre, esiste la tendenza, soprattutto nelle terapie intensive, a richiedere ogni giorno (ma in alcuni casi anche più volte al giorno) ampi pannelli di indagini nella presunzione che i pazienti critici, indipendentemente dalla patologia, necessitino per definizione di una stretta sorveglianza di tutti i parametri ematochimici: ad es., esami quali calcemia e fosforemia vengono frequentemente richiesti giornalmente per la profilassi delle aritmie, nonostante la loro determinazione non sia indicata per questo scopo, mentre l'emogasanalisi spesso viene eseguita ogni 12 ore anche in pazienti che ventilano autonomamente e non presentano variazioni significative dello stato clinico (47). Nelle terapie intensive spesso ogni medico che viene in contatto con il paziente tende a chiedere nuovi esami, indipendentemente da quelli già effettuati in precedenza (15, 50). Tutto questo determina che, come detto in precedenza, i pazienti critici siano coloro ai quali generalmente viene sottratto più sangue per indagini diagnostiche e di monitoraggio ematochimico (Tabella 1).

Ogni esame richiesto dovrebbe essere ponderato accuratamente per essere certi che il suo risultato fornisca indicazioni cliniche utili in quel preciso momento e che tali informazioni non siano già disponibili. Le richieste inoltre dovrebbero essere personalizzate per ciascun paziente e gli intervalli tra due ripetizioni della stessa analisi dovrebbero essere in accordo a tempi di ripetizione il più possibile standardizzati (51). Sarebbe auspicabile anche che venisse prestata attenzione nel richiedere tutti gli esami possibili sul numero minore possibile di provette, evitando di chiedere esami potenzialmente eseguibili sullo stesso campione in momenti diversi e di chiedere analisi in regime ordinario troppo ravvicinate a quelle eseguite in urgenza, con la necessità di ripetere inutilmente il prelievo (22).

Per quanto possa sembrare "invasivo" nei confronti dei colleghi clinici, il monitoraggio da parte del laboratorio delle richieste pervenute dai reparti e l'applicazione degli interventi necessari a garantire il rispetto dell'appropriatezza prescrittiva sono assolutamente necessari e a completo beneficio del paziente (15). Il laboratorio ha in questo senso a disposizione molti strumenti, quali l'organizzazione di programmi formativi mirati a sensibilizzare il personale clinico sul problema dell'HAA e delle sue possibili soluzioni (52), la stesura di protocolli condivisi con i clinici e con i comitati di PBM e l'informatizzazione delle richieste provenienti dai reparti, che in questo modo possono essere monitorate ed eventualmente limitate e regolate mediante l'inserimento di tempi minimi per il "retesting", la creazione di profili concordati per reparto o per specifico problema clinico o la comparsa di avvertimenti che ricordino al richiedente l'appropriato utilizzo di una determinata analisi (53, 54).

Sangue prelevato in eccesso

È stato stimato che nel mondo occidentale vengono buttati ~25 milioni di litri di sangue ogni anno (55) e che i volumi di sangue raccolti per le indagini di laboratorio possono superare di più di 40 volte le quantità necessarie per l'effettiva esecuzione degli esami (26).

Un problema rilevante, ancora una volta preminente soprattutto nelle terapie intensive, è l'elevata percentuale di pazienti portatori di cateteri centrali venosi o arteriosi (56). La presenza di un catetere, oltre a rendere più agevole il prelievo, aumentando quindi, almeno potenzialmente, la facilità e la frequenza con cui lo si esegue (22), rende anche necessario il lavaggio del tubo, per evitare la contaminazione o la diluizione del campione con le soluzioni somministrate per via endovenosa, scartando una quantità di sangue almeno pari al volume del catetere stesso. Questo aumenta significativamente la quantità di sangue che viene sottratta al paziente (22, 29), senza contare che spesso la quantità di sangue scartata varia significativamente da operatore a operatore e può arrivare anche a superare i 10 mL, quando un volume di 5 mL risulta più che sufficiente per un adeguato lavaggio (37).

Oltre a questo, però, a determinare la grande quantità di sangue che viene prelevata in eccesso può contribuire direttamente e in maniera significativa il laboratorio stesso. Negli ultimi decenni, i volumi analitici richiesti dalle strumentazioni hanno subito delle contrazioni importanti (57). Ciononostante, i laboratori spesso continuano a raccogliere campioni di volume molto superiore al necessario per ragioni varie: necessità di volumi morti, eventuale ripetizione dell'analisi anche a diluizioni diverse, ecc. (58). La raccolta di un volume superiore a quello strettamente necessario può andare a beneficio del paziente, perché riduce il rischio di dover ripetere il prelievo migliorando il "turnaround time" (26). In generale, però, nella maggioranza dei casi le indicazioni per i volumi di prelievo fornite dai laboratori sovrastimano considerevolmente la quantità di campione necessario e potrebbero essere ridotte senza impattare minimamente sulla qualità del risultato (59). A questo proposito, sono stati eseguiti diversi studi, che dimostrano come l'utilizzo di provette di dimensioni ridotte o di tipo pediatrico riduca significativamente le perdite iatrogene di sangue, portando anche, in alcuni casi, a riduzioni nell'incidenza di HAA (19, 24, 34, 37, 60). Attualmente però, molti analizzatori automatici non sono in grado di gestire provette di piccole dimensioni (15). Lo sforzo principale per il futuro da parte dei produttori di sistemi analitici dovrebbe quindi non solo essere rivolto verso lo sviluppo di strumenti che impiegano volumi di campione sempre più ridotti, ma anche verso la produzione di strumenti che siano in grado di gestire provette di volume più piccolo. A questo proposito, alcune ditte commerciali producono provette di dimensioni standard, ma a riempimento parziale o a ridotto volume interno, e adattatori che consentono l'utilizzo delle provette pediatriche sulle piattaforme

Tabella 2*Strategie per minimizzare le perdite di sangue a scopo diagnostico*

Laboratorio	Clinica
Utilizzo di provette a volume ridotto	Prelevare solo se esistono reali necessità cliniche
Utilizzo di strumenti che necessitano di minori volumi analitici	Appropriatezza delle richieste
Minimizzare la quantità di campione sprecato	Gestione corretta dei cateteri vascolari
Introduzione in particolari situazioni di sistemi di "point-of-care testing"	Utilizzo di sistemi di monitoraggio non invasivi
Eliminazione di esami obsoleti	Standardizzazione delle procedure di prelievo
Redazione di protocolli condivisi con i clinici	
Introduzione del "minimum retesting interval"	
Informatizzazione delle richieste	
Organizzazione di programmi formativi	

analitiche attualmente disponibili (58, 59).

Un risparmio di sangue inoltre può essere ottenuto mediante la riorganizzazione del dipartimento di medicina di laboratorio verso un modello "decision making-based", che grazie alla centralizzazione delle analisi di primo livello, all'eliminazione dai menu di richiesta degli esami obsoleti e al consolidamento strumentale permette di eseguire molte più determinazioni su un numero ridotto di campioni, oltre che di gestire in maniera automatica e ottimizzata le fasi pre- e post-analitica (aliquotazione, "rerun" e diluizioni, conservazione, ecc.) (61).

Infine, l'utilizzo di strumentazioni di "point-of-care testing" (POCT) dovrebbe essere preso in considerazione, soprattutto nei pazienti pediatrici, in quanto richiedono quantità di campione infinitesimali rispetto ai normali analizzatori (15). Tuttavia, prima della loro implementazione in una struttura ospedaliera, le prestazioni di questi strumenti andrebbero sempre verificate e confrontate con quelle degli strumenti presenti in laboratorio, per evitare che risultati non accurati possano costituire un rischio per la sicurezza dei pazienti (62, 63).

Nella Tabella 2 sono riassunte le diverse strategie che, nell'ambito del PBM, possono contribuire al risparmio del sangue prelevato per indagini ematochimiche.

CONCLUSIONI

HAA è una patologia iatrogena che può colpire un buon numero di pazienti ospedalizzati, soprattutto se in condizioni critiche. Una delle cause principali di HAA è l'elevata quantità di sangue che viene prelevata ai pazienti per l'esecuzione degli esami ematochimici. Molto spesso questa patologia risulta misconosciuta ai medici, che generalmente non associano i significativi abbassamenti dei valori di Hb nei pazienti ricoverati con il volume totale di sangue prelevato per scopi diagnostici o di monitoraggio. Tuttavia, questo può provocare un peggioramento della prognosi del

paziente, anche a causa dei rischi derivati dalle trasfusioni allogene, necessarie quando i pazienti si anemizzano gravemente. L'implementazione di strategie per la gestione del sangue del paziente è quindi necessaria per minimizzare il rischio di sviluppo di HAA, soprattutto nei reparti di terapia intensiva e di patologia neonatale, e per migliorare i tassi di morbilità e mortalità dei pazienti. Tale approccio richiede una collaborazione multidisciplinare tra clinica e laboratorio, che agendo in maniera coordinata possono ridurre significativamente la quantità di sangue sottratta ai pazienti per l'esecuzione delle indagini di laboratorio. In particolare, è auspicabile che venga ridotta la frequenza con cui gli esami sono richiesti, mediante monitoraggio dell'appropriatezza delle richieste, che si riduca il più possibile il volume di sangue scartato per il lavaggio dei cateteri vascolari e che venga implementato l'utilizzo di dispositivi che riducano gli sprechi, come provette a volume ridotto o di tipo pediatrico, o sistemi per POCT. Infine, la riorganizzazione del dipartimento di medicina di laboratorio verso modelli maggiormente attenti al binomio efficienza-efficacia può ridurre le quantità di sangue prelevato, grazie all'ottimizzazione della gestione dei campioni e alla possibilità di eseguire molte più determinazioni su un unico campione, mediante sistemi di "total laboratory automation" (61).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Choorapoikayil S, Zacharowski K, Meybohm P. Patient blood management: is it worth to be employed? *Curr Opin Anesthesiol* 2016;29:186-91.
2. Koch CG, Li L, Hixson ED, et al. Hospital-acquired anemia: prevalence, outcomes, and healthcare implications. *J Hosp Med* 2013;8:506-12.
3. World Health Organization: Blood Transfusion Safety. The clinical use of blood - Handbook, 2002. http://www.who.int/bloodsafety/clinical_use/en/Handbook_EN.pdf?ua=1

4. Sixty-third World Health Assembly. Availability, safety and quality of blood products. WHA63.12, 2010 http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_R12-en.pdf
5. Ibister JP. The three-pillar matrix of patient blood management – An overview. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2013;27:69-84.
6. Fowler RA, Berenson M. Blood conservation in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2003;31:S715-20.
7. Noguez J. Tackling hospital-acquired anemia. Lab-based interventions to reduce diagnostic blood loss. *Clin Lab News* April 2016 vol. 42, n. 04.
8. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. WHO/NMH/NHD/MNM/11.1, 2011 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85839/3/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf
9. Salisbury AC, Reid KJ, Alexander KP, et al. Diagnostic blood loss from phlebotomy and hospital-acquired anemia during acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2011;171:1646-53.
10. Martin ND, Scantling D. Hospital-acquired anemia. A contemporary review of etiologies and prevention strategies. *J Infus Nurs* 2015;38:330-8.
11. Adamson JW, Longo DL. Anemia and polycythemia. *Harrison's principles of internal medicine*, vol. 1. 18th ed. New York: Mc Graw-Hill Medical, 2012:448-57.
12. Vincent JL, Baron JF, Reinhart K, et al. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA* 2002;288:1499-507.
13. Corwin HL, Gettinger A, Pearl RG, et al. The CRIT study: anemia and blood transfusion in the critically ill — Current clinical practice in the United States. *Crit Care Med* 2004;32:39-52.
14. Chant C, Wilson G, Friedrich JO. Anemia, transfusion, and phlebotomy practices in critically ill patients with prolonged ICU length of stay: a cohort study. *Crit Care* 2006;10:R140.
15. Jakacka N, Snarski E, Mekuria S. Prevention of iatrogenic anemia in critical and neonatal care. *Adv Clin Exp Med* 2016;25:191-7.
16. Kuruvilla DJ, Widness JA, Nalbant D, et al. A mass balance-based semiparametric approach to evaluate neonatal erythropoiesis. *AAPS J* 2016;18:187-95.
17. Kress JP, Hall JB. Approach to the patient with critical illness. *Harrison's principles of internal medicine*, vol. 2. 18th ed. New York: Mc Graw-Hill Medical, 2012:2196-204.
18. Hayden SJ, Albert TJ, Watkins TR, et al. Anemia in critical illness. Insights into etiology, consequences, and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1049-57.
19. Kurniali PC, Curry S, Brennan KW, et al. A retrospective study investigating the incidence and predisposing factors of hospital-acquired anemia. *Anemia* 2014;2014:634582.
20. Eyster E, Bernene J. Nosocomial anemia. *JAMA* 1973;233:73-4.
21. Henry ML, Garner WL, Fabri PJ. Iatrogenic anemia. *Am J Surg* 1986;151:362-3.
22. Smoller BR, Kruskall MS. Phlebotomy for diagnostic laboratory tests in adults. Pattern of use and effect on transfusion requirements. *N Engl J Med* 1986;314:1233-5.
23. Foulke GE, Harlow DJ. Effective measures for reducing blood loss from diagnostic laboratory tests in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1989;17:1143-5.
24. Smoller BR, Kruskall MS, Horowitz GL. Reducing adult phlebotomy blood loss with the use of pediatric-sized blood collection tubes. *Am J Clin Pathol* 1989;91:701-3.
25. Tarpey J, Lawler PG. Iatrogenic anemia? A survey of venesection in patients in the intensive therapy unit. *Anaesthesia* 1990;45:396-8.
26. Dale JC, Pruett SK. Phlebotomy - A minimalist approach. *Mayo Clin Proc* 1993;68:249-55.
27. Silver MJ, Li YH, Gragg LA, et al. Reduction of blood loss from diagnostic sampling in critically ill patients using a blood-conserving arterial line system. *Chest* 1993;104:1711-5.
28. Corwin HL, Parsonnet KC, Gettinger A. RBC transfusion in the ICU. Is there a reason. *Chest* 1995;108:767-71.
29. Low LL, Harrington GR, Stoltzfus DP. The effect of arterial lines on blood-drawing practices and costs in intensive care units. *Chest* 1995;108:216-9.
30. Nguyen BV, Bota DP, Mélot C et al. Time course of hemoglobin concentrations in nonbleeding intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2003;31:406-10.
31. Wisser D, Van Ackern K, Knoll E et al. Blood loss from laboratory tests. *Clin Chem* 2013;49:1651-5.
32. Thavendiranathan P, Bagai A, Ebidia A, et al. Do blood tests cause anemia in hospitalized patients? The effect of diagnostic phlebotomy on hemoglobin and hematocrit levels. *J Gen intern Med* 2005;20:520-4.
33. Shaffer C. Diagnostic blood loss in mechanically ventilated patients. *Heart Lung* 2007;36:217-22.
34. Sanchez-Giron F, Alvarez-Mora F. Reduction of blood loss from laboratory testing in hospitalized adult patients using small-volume (pediatric) tubes. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1916-9.
35. Mendoza Delgado MD, Suero Zunon R, Sanchez Sanchez ML. Drawing of blood and anemia of the critical patient. *Enferm Intensiva* 2009;20:141-7.
36. Pabla L, Watkins E, Doughty HA. A study of blood loss from phlebotomy in renal medical inpatients. *Transfus Med* 2009;19:309-14.
37. Coene KLM, Roos AN, Scharnhorst V. Iatrogenic anemia/Twenty-five million liters of blood into the sewer: comment. *J Thromb Haemost* 2015;13:1160-1.
38. Koch CG, Reineks EZ, Tang AS et al. Contemporary bloodletting in cardiac surgical care. *Ann Thorac Surg* 2015;99:779-85.
39. Lyon AW, Chin AC, Slotsve GA, et al. Simulation of repetitive diagnostic blood loss and onset of iatrogenic anemia in critical care patients with a mathematical model. *Comput Biol Med* 2013;43:84-90.
40. Lin JC, Strauss RG, Kulhavy JC, et al. Phlebotomy overload in the neonatal intensive care nursery. *Pediatrics* 2000;106:E19.
41. Papa F, Rongioletti M, Della Ventura M, et al. Blood cell counting in neonates: a comparison between a low volume micromethod and the standard laboratory method. *Blood Transfus* 2011;9:400-6.
42. McEvoy MT, Shander A. Anemia, bleeding, and blood transfusions in the intensive care unit: causes, risks, costs, and new strategies. *Am J Crit Care* 2013;22:eS1-12.
43. Costa Filho RC, Gutierrez F, Fernandes H, et al. Red blood cell transfusion in the intensive care setting: controversies amongst evidence. *Rev Bras Ter Intensiva* 2009;21:315-23.
44. Fischer DP, Zacharowski KD, Meybohm P. Savoring every drop - vampire or mosquito? *Crit Care* 2014;18:306.
45. Fischer DP, Zacharowski KD, Müller MM, et al. Patient blood management implementation strategies and their effect on physicians' risk perception, clinical knowledge and perioperative practice – The Frankfurt experience. *Transfus Med Hemother* 2015;42:91-7.
46. Zimmerman JE, Seneff MG, Sun X, et al. Evaluating laboratory usage in the intensive care unit: Patient and institutional characteristics that influence frequency of

- blood sampling. *Crit Care Med* 1997;25:737-48.
47. Wang TJ, Mort EA, Nordberg P, et al. A utilization management intervention to reduce unnecessary testing in the coronary care unit. *Arch Intern Med* 2002;162:1885-90.
 48. Solomon DH, Hashimoto H, Daltroy L, et al. Techniques to improve physicians' use of diagnostic tests. A new conceptual framework. *JAMA* 1998;16:2020-7.
 49. Panteghini M. The future of Laboratory Medicine: understanding the new pressures. *Biochim Clin* 2004;28:475-81.
 50. Valenstein P, Leiken A, Lehmann C. Test-ordering by multiple physicians increases unnecessary laboratory examinations. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:238-41.
 51. The Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine. National minimum re-testing interval-project: a final report detailing consensus recommendations for minimum re-testing intervals for use in clinical biochemistry. 2013. <http://www.acb.org.uk/docs/default-source/guidelines/acb-mri-recommendations-a4-computer.pdf>
 52. Thakkar RN, Kim D, Knight AM, et al. Impact of an educational intervention on the frequency of daily blood test orders for hospitalized patients. *Am J Clin Pathol* 2015;143:393-7.
 53. Procop GW, Yerian LM, Wyllie R, et al. Duplicate laboratory test reduction using a clinical decision support tool. *Am J Clin Pathol* 2014;14:718-23.
 54. Pageler NM, Franzon D, Longhurst CA, et al. Embedding time-limited laboratory orders within computerized provider order entry reduces laboratory utilization. *Ped Crit Care Med* 2013;14:413-9.
 55. Levi M. Twenty-five million liters of blood into the sewer. *J Thromb Haemost* 2014;12:1592.
 56. Barie PS. Phlebotomy in the intensive care unit: strategies for blood conservation. *Crit Care* 2004;8:S34-6.
 57. Hicks JM. Excessive blood drawing for laboratory tests. *N Engl J Med* 1999;340:1690.
 58. Stefanini M. Iatrogenic anemia (can it be prevented?). *J Thromb Haemost* 2014;12:1591.
 59. Dale JC, Ruby SG. Specimen collection volumes for laboratory tests. A College of American Pathologists study of 140 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:162-8.
 60. Dolman HS, Evans K, Zimmerman LH, et al. Impact of minimizing diagnostic blood loss in the critically ill. *Surgery* 2015;158:1083-7.
 61. Ferraro S, Braga F, Panteghini M. Laboratory medicine in the new healthcare environment. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:523-33.
 62. Aloisio E, Frusciante E, Dolci A, et al. Verifica dell'accuratezza di tre glucometri "point-of-care" per l'utilizzo in ambito ospedaliero. *Biochim Clin* 2017;41:79-84.
 63. Aloisio E, Panzeri A, Birindelli S, et al. Validazione per l'impiego clinico delle determinazioni di emoglobina ed ematocrito sull'emogasanalizzatore GEM Premier 4000. *Biochim Clin* 2017;41:189-91.

Il laboratorio clinico nelle indagini tossicologiche*

Elena Barzon¹, Vincenzo Balestra², Giuliano Dall'Olio¹, Pietro Papa³, Manuela Pellegrini⁴, Gianni Testino⁵, Tommaso Trenti⁶, Agnese Veronesi⁷, Davide Giavarina¹

¹Laboratorio Analisi Cliniche, Ospedale San Bortolo, ULSS 8 Berica

²Servizio Territoriale per le Dipendenze (SerD), ULSS 8 Berica

³Laboratorio Tossicologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

⁴Centro Nazionale Dipendenze e Doping, Istituto Superiore di Sanità, Roma

⁵U.O. Alcolologia e Patologie Correlate, IRCCS Ospedale San Martino-IST, Genova

⁶U.O. Patologia Clinica, Tossicologia e Diagnostica Avanzata, e ⁷Laboratorio Antidoping della Regione Emilia Romagna, Nuovo Ospedale Sant'Agostino Estense, Modena

ABSTRACT

The role of clinical laboratory in toxicological investigations. Clinical toxicology laboratory activities are carried out both for clinical purposes, providing support to the diagnosis and treatment of intoxicated patients, and for medico-legal aspects, providing data with value of judicial proof. The new Italian law (no. 41, March 23, 2016) considers vehicular homicide and road traffic injuries criminal offences to be severely punished, especially if the driver is under the influence of alcohol or psychotropic substances. Since toxicology results have an impact on administrative and legal decisions, analytical reliability and traceability of data, including the implementation of a chain of custody of samples, are crucial. Forensic toxicological analyses use conventional matrices (blood and urine) and alternative matrices (hair, saliva, sweat). To assess the current use of illicit drugs, blood is the matrix of choice because substance concentrations correlate with subject's physical and mental status at the time of collection. On the other hand, urine testing is simple, rapid and non-invasive. A positive result indicates that the substance assumption was from several hours to a few days prior to sampling. The hair matrix is suitable to identify past use or abuse and segmental hair analysis allows the reconstruction of the history of abuse. Analytical methods for alcohol and drugs of abuse include qualitative screening tests and quantitative confirmatory tests. A negative result of the screening test does not require further investigation, while a positive result cannot assume forensic value without confirmatory analysis. The use of mass spectrometry in combination with chromatographic or electrophoretic separation techniques for confirmatory tests has found the consensus of the international scientific community.

CENNI STORICI

Uno dei primi cenni delle applicazioni della chimica alla tossicologia si può ravvisare nell'opera *Elementa Medicinae et Chirurgiae Forensis*, pubblicata nel 1781 dal medico viennese Joseph Plenck (1738-1807), dove si sancisce che la certezza di veleno con sostanze minerali è il riscontro del veleno nei reperti autoptici mediante l'analisi chimica (1). Questa possibilità di indagare sull'eventuale assunzione di sostanze venefiche comincia a concretizzarsi verso la metà dell'Ottocento quando la chimica analitica può disporre di

metodi attendibili e sufficientemente sensibili per rilevare anche sostanze estratte dai vegetali come gli alcaloidi (2, 3). L'identificazione del primo alcaloide è attribuita al farmacista tedesco Friedric W. Sertürner (1783-1841), che nel 1805 isola dal succo condensato dell'oppio la "morfinina", sostanza con proprietà alcaline (4).

Alla fine del secolo gli alcaloidi vegetali noti ammontano a un centinaio. Gli alcaloidi si rivelano essere ottimi medicinali a piccolissime dosi, ma diventano letali veleni a dosi poco più elevate. La conoscenza della loro natura chimica si dimostra subito preziosa per la tossicologia, poiché nel corso

*Questa rassegna rappresenta un compendio delle relazioni presentate al Convegno "Il Laboratorio clinico nelle indagini tossicologiche", Vicenza, 26 maggio 2016.

Corrispondenza a: Elena Barzon, Laboratorio Analisi Cliniche, Ospedale San Bortolo, Viale Rodolfi 37, 36100 Vicenza. Tel. 0444 753648, Fax 0444752501, E-mail elena.barzon@aulss8.veneto.it

Ricevuto: 28.02.2017

Revisionato: 28.03.2017

Accettato: 07.04.2017

Publicato on-line: 02.08.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.039

dell'Ottocento aumenta il loro uso in casi di veneficio criminoso o volontario. Numerosi furono quindi gli studi sulle proprietà e sulla chimica analitica degli alcaloidi per rispondere al quesito dei magistrati circa la loro presenza nell'organismo nei casi di sospetto veneficio. Alla realizzazione di metodologie di estrazione dei veleni da materiale biologico e reattivi per la loro rivelazione e identificazione si dedicano farmacisti, medici, e chimici: Jean Servais Stas (1813-1891), Friedrich Julius Otto (1809-1870), Johann Georg Dragendorff (1836-1898) e Karl Friedrik Mandelin (1854-1906).

La chimica tossicologica conosce un momento di insicurezza nella seconda metà dell'Ottocento quando nel 1872 Francesco Selmi, cattedratico di Chimica Farmaceutica e Tossicologica a Bologna, pubblica una memoria sulle ptomaine, sostanze basiche prodotte da fenomeni putrefattivi, che egli aveva scoperto nelle viscere dei cadaveri (5, 6). Le ptomaine (o alcaloidi cadaverici) nelle indagini chimico-tossicologiche si comportano nella stessa maniera degli alcaloidi vegetali e quindi si confondono facilmente con questi, con tutti i risvolti giudiziari che ne possono derivare. La situazione è talmente confusa e complessa che il Ministro di Grazia e Giustizia nel 1880 nomina una commissione per l'accertamento dei reati di veneficio per evitare dannosi equivoci. Sarà Francesco Selmi, in una sua memoria del 1880, a risolvere il problema dettando precisi criteri per distinguere gli alcaloidi vegetali dalle ptomaine (7).

La chimica tossicologica entra nei laboratori di chimica clinica degli ospedali nella seconda metà del Novecento a seguito dei problemi connessi con il diffondersi dell'uso di sostanze stupefacenti nella popolazione giovanile. Inizia negli Stati Uniti d'America la promulgazione di leggi federali con protocolli e metodi per la ricerca di droghe d'abuso e loro metaboliti nelle urine, per controllare e contrastare il fenomeno dell'assunzione di sostanze illecite diffuso nei reduci della guerra del Vietnam, nei posti di lavoro e negli atleti. I primi metodi di analisi, come la cromatografia su strato sottile (TLC), per rilevare nelle urine gli oppiacei e le amfetamine sono lunghi, indaginosi e poco sensibili, mentre è ancora più complicato l'esame per i cannabinoidi. Un importante passo avanti si ha con l'immissione sul mercato nel 1972 di un metodo immunoenzimatico omogeneo (EMIT), che non richiede separazioni e utilizza la tecnica spettrofotometrica già diffusa nei laboratori clinici (8).

Anche in Italia l'applicazione su autoanalizzatori di questo e altri metodi immunometrici risolve il problema dello screening delle principali sostanze d'abuso presenti sul mercato, richiesto dapprima esclusivamente per uso clinico. Agli inizi del XXI secolo nuove normative, soprattutto nel Codice della Strada (CdS) e per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o assunzione di sostanze stupefacenti nei lavoratori con particolari mansioni, impongono la ricerca chimico-analitica su varie matrici biologiche (urina, sangue, capelli), procedure di raccolta e conservazione dei campioni, inconsuete nei laboratori clinici, e la conferma dei risultati di screening con metodi analitici appropriati.

Molti laboratori ospedalieri devono quindi affrontare l'implementazione di tecniche analitiche basate sull'utilizzo di gas o liquido cromatografia accoppiata a spettrometri di massa, che richiedono particolari conoscenze analitiche, e seguire norme dettate da specifiche linee guida.

USO DI SOSTANZE STUPEFACENTI: ASPETTI CLINICI ED EPIDEMIOLOGICI

L'uso di "sostanze" a scopo voluttuario è noto dai tempi antichi. Il termine "uso" può alludere anche a un'utilizzazione abituale, associata a un'inclinazione personale. L'"abuso" di sostanze è una modalità patologica, che porta a menomazione o a un disagio clinicamente significativo per un periodo prolungato. Manifestazioni correlate all'abuso possono essere l'incapacità ad adempiere ai principali compiti connessi con il ruolo sul lavoro, a scuola o a casa; comportamenti fisicamente rischiosi, ad es., alla guida dell'auto; problemi legali; persistenti e ricorrenti problemi sociali o interpersonali causati o esacerbati dagli effetti della sostanza. Il termine "dipendenza" si riferisce a un insieme di elementi che prevedono la sintomatologia da astinenza, ossia la comparsa di una specifica sintomatologia a seguito della sospensione di una sostanza; la tolleranza, con una diminuzione dell'effetto con l'uso continuativo; la perdita del controllo; il "craving" o appetizione patologica per la sostanza, il cambiamento di stile di vita e di pensiero; il danno fisico, psichico e sociale. Tuttavia, nella quinta versione del manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali (DSM-5), la parola "dipendenza" non si applica più come termine diagnostico nella classificazione (9). Tale scelta è stata operata a causa della sua incerta definizione e della sua connotazione potenzialmente negativa. Il termine più neutro "disturbo da uso di sostanze" è utilizzato per descrivere l'ampia gamma del disturbo stesso, da forme più lievi a quelle più gravi, caratterizzate da ricadute croniche con assunzione compulsiva.

Le sostanze in assoluto più consumate sono alcol e cannabinoidi. Negli ultimi anni si nota inoltre, dopo un periodo di lieve flessione, anche l'aumento del consumo di tabacco, soprattutto tra le donne. Numerose sono tuttavia le sostanze illecite, elencate nelle 4 tabelle del Testo unico sugli stupefacenti (DPR 309/90), aggiornato dalla Legge 16 maggio 2014, n. 79, con l'aggiunta della quinta tabella dei medicinali a base di sostanze attive stupefacenti e psicotrope di corrente impiego terapeutico a uso umano o veterinario (10). Le tabelle sono costantemente aggiornate, ma si sta sempre di più diffondendo l'uso di droghe nuove o sintetiche, acquistabili in internet e che spesso non sono incluse nelle attuali tabelle delle sostanze illecite. Tali sostanze vengono anche denominate "smart drugs" (droghe furbe) o "designer drugs" (droghe progettate in laboratorio). Spesso le situazioni più frequenti sono quelle del policonsumo (11).

Vi è stata inoltre in questi anni una progressiva caduta d'interesse nei confronti del problema abuso e

dipendenza, che rischia di normalizzarsi come un fatto accettato e inevitabile nella nostra società.

La dipendenza si instaura prevalentemente nell'adolescenza. Per la stragrande maggioranza degli adolescenti il consumo si colloca in una fase del loro ciclo di crescita e si esaurisce nel passaggio alla fase adulta, quando la vita li porterà a fare altre scelte (consumo transitorio, generalmente ludico-ricreativo). Solo una minima parte resta intrappolata in una dinamica di abuso e dipendenza (consumo identitario e/o autoterapeutico). Gli obiettivi principali dei programmi terapeutici, rivolti a questi soggetti, sono:

- ridurre/sospendere l'uso di sostanze stupefacenti,
- migliorare la qualità della vita del soggetto e della famiglia,
- ridurre/annullare il rischio di patologie correlate e, comunque, curarle in caso di insorgenza,
- reintegrare il soggetto sia da un punto di vista sociale/relazionale che da un punto di vista lavorativo /scolastico,
- ridurre/annullare i comportamenti devianti.

Il trattamento è multimodale e l'iter terapeutico è lungo. I trattamenti funzionano e quindi è infondata la critica pregiudiziale legata al pensiero che i tossicodipendenti siano incurabili (12). Infatti, è possibile ottenere la riduzione nell'uso di droghe o anche la totale sospensione con persistenza per molti mesi o anni, migliorando grandemente la qualità di vita dei soggetti.

ANALISI DI SOSTANZE DI ABUSO CON FINALITÀ MEDICO-LEGALI

La determinazione di alcol e sostanze stupefacenti in campioni biologici con finalità medico-legale richiede una particolare capacità analitica e interpretativa, al fine di corrispondere un risultato il più possibile univoco. Queste indagini, infatti, presentano la peculiarità di assumere il valore di prova giudiziaria, con ricaduta in campo penale, amministrativo e lavorativo. Gli ambiti di applicazione di tali analisi sono elencati nella Tabella 1.

La consapevolezza che i risultati tossicologici non abbiano solo una ricaduta in termini di diagnosi e terapia, ma conducano a decisioni amministrative, legali e penali,

ha indotto a porre massima attenzione alle caratteristiche di affidabilità del dato analitico, all'attuazione di rigorosi programmi di controllo, all'aggiornamento delle procedure, alla tracciabilità di ogni fase del processo, con l'obiettivo di definire i requisiti minimi per questo tipo di laboratori. Le linee guida dei tossicologi forensi italiani offrono alle strutture dotate di specifici e dedicati laboratori, in grado di eseguire accertamenti di sostanze d'abuso a scopo forense, uno strumento di riferimento per un corretto approccio improntato all'armonizzazione e alla confrontabilità dei risultati (13). L'obiettivo è quello di affidare la prevenzione e il controllo di alcuni comportamenti sociali a laboratori adeguatamente attrezzati e preparati, rendendo il più possibile omogeneo il risultato ottenuto sull'intero territorio nazionale.

Accanto agli adeguati procedimenti analitici, è fondamentale istituire una catena di custodia che documenti la storia cronologica del campione dalla raccolta fino alla refertazione del risultato e al suo smaltimento. Essa deve permettere di ricostruire l'iter del campione all'interno del laboratorio, di conservarlo e di preservarlo in tutte le fasi da manomissioni, nonché di individuarne tutte le movimentazioni e manipolazioni (registrazione di date, orari e firme del personale che lo ha avuto in carico). Le analisi tossicologiche in ambito forense prevedono l'esame di matrici convenzionali (sangue e urina) e di matrici alternative (matrice pilifera, fluido orale, sudore). Nei casi in cui si debba valutare l'attualità d'uso di sostanze illecite, le indagini devono essere necessariamente eseguite su sangue o saliva. Il sangue costituisce la matrice biologica di elezione per le indagini cliniche e forensi in quanto la concentrazione ematica della sostanza ricercata consente di stabilire o di escludere la recente assunzione ed è direttamente correlabile allo status psicofisico del soggetto al momento della raccolta. L'esame delle urine può essere eseguito per motivi di semplicità, rapidità o di non invasività e la positività dell'analisi indica che la sostanza è stata assunta da alcune ore ad alcuni giorni prima del prelievo. In caso di positività del campione urinario e in assenza di prelievo ematico o salivare, non vi è la certezza dell'eventuale stato di alterazione psico-fisica dal momento che la rilevabilità di una sostanza e dei suoi

Tabella 1

Ambiti civili e penali in cui trovano applicazione le indagini tossicologiche

Codice della strada (art. 186 -187 NCdS)
Idoneità alla guida (art. 119 NCdS)
Determinazione requisiti psicofisici per il rilascio del porto d'armi (GU 304/1991)
Accertamenti urgenti (Art. 354 CPP)
Assicurazione fonti di prova (Art. 348 CPP)
Prefettura e Procura (DPR 309/1990)
Accertamenti sui lavoratori (Accordo S.R. 18/9/2008)
Idoneità genitoriale
Trattamenti sostitutivi
Causa/concausa di morte

metaboliti nell'urina può protrarsi anche oltre la sua completa eliminazione dal sangue. La matrice pilifera è idonea per identificare comportamenti pregressi di uso/abuso e l'analisi segmentale dei capelli consente di ricostruire la cronologia dell'assunzione.

Le metodologie analitiche per la determinazione di laboratorio delle sostanze d'abuso, in base a esigenze analitiche, procedurali, organizzative ed economiche, si distinguono in test di screening e test di conferma.

I test di screening sono analisi preliminari che forniscono risultati presuntivi (probabile negatività o positività/non negatività) di un campione rispetto a una sostanza/classe di sostanze e in riferimento a un valore di cut-off prestabilito. Questi processi analitici sono quindi:

- preliminari, in quanto necessitano di un successivo esame di conferma;
- in relazione a cut-off (i risultati sono da mettere in relazione a valori soglia stabiliti da norme e/o convenzioni);
- qualitativi (risultato positivo o negativo).

L'esito negativo di un'analisi di screening è generalmente accettato come valido e non necessita di ulteriori indagini, mentre un risultato positivo non può assumere valenza forense se non viene verificato da un'analisi di conferma. Nell'ambito della tossicologia forense, l'impiego della spettrometria di massa in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico o elettroforetico per analisi di conferma ha trovato il consenso generale della comunità scientifica internazionale. Mentre la risposta dei test di screening deve essere espressa in termini qualitativi (assenza o presenza in relazione al cut-off), i risultati ottenuti dai test di conferma sono da esprimere per singola sostanza in termini quantitativi.

Ruolo del laboratorio clinico nella valutazione di primo livello

Le metodiche analitiche che si possono utilizzare in fase di screening sono per la maggior parte di tipo immunometrico [polarizzazione della luce fluorescente-(FPIA), inibizione dell'attività enzimatica (EMIT o DRI), interazione cinetica di microparticelle in soluzione (KIMS), "cloned enzyme donor immunoassay" (CEDIA)] (14). Per ognuna di queste tecniche esistono in commercio diversi metodi che possono differire per la

scelta dell'anticorpo, per la metodologia di esecuzione dell'esame e per sensibilità e specificità. I metodi immunochimici di screening sono caratterizzati da costi contenuti, tempi di esecuzione rapidi, elevata o totale automazione. Per contro, tali metodi presentano ridotta specificità e significativa inaccuratezza, in particolare quando nel campione sono presenti più specie chimiche in grado di essere rilevate, ma non discriminate dal metodo (ad es., composto immodificato e suoi metaboliti). Essendo basati sulla reazione antigene-anticorpo, la specificità di questi metodi può non essere rivolta alla singola sostanza, ma piuttosto al gruppo di sostanze (specificità di gruppo). Risultati falsi positivi possono essere causati sia dalla presenza di sostanze lecite appartenenti alla stessa famiglia per cui è stato creato l'anticorpo, sia di sostanze con struttura chimica diversa, ma comunque in grado di legare l'anticorpo. Questi metodi, per le loro caratteristiche intrinseche, producono un risultato preliminare che indica la probabile positività del campione rispetto a un analita, o più spesso a una classe di sostanze, relativamente a un valore di cut-off prestabilito. Essi permettono pertanto di escludere i campioni che risultano negativi, ossia quei campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze indagata oppure quelli in cui la concentrazione è al di sotto di un valore soglia. Non bisogna però confondere il valore del cut-off con il limite di quantificazione del metodo, che è la più bassa concentrazione che può essere misurata con sufficiente accuratezza. Il cut-off o soglia decisionale è invece il limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale, per stabilire la negatività ovvero la positività di un campione. Il valore di cut-off, pertanto, può variare dipendendo dall'ambito di applicazione dell'analisi. La "Substance abuse and mental health services administration" (SAMSHA) è il principale punto di riferimento internazionale in questo campo e i valori consigliati da questo organismo vengono adottati dalle aziende del settore e dai laboratoristi che si occupano di screening tossicologico (15). Nella Tabella 2 vengono messi a confronto i cut-off della SAMSHA, quelli indicati nel provvedimento del 18 settembre 2008 riguardante le analisi su lavoratori con mansioni a rischio (G.U. n. 236, 8/10/2008) e quelli delle linee guida del Gruppo dei Tossicologi Forensi Italiani (GTFI) (13). Tali cut-off sono uguali nel caso di alcune sostanze e differenti nel caso di altre, in quanto rispecchiano realtà di

Tabella 2

Concentrazioni soglia (cut-off) in µg/L nei test di screening riportate da "Substance abuse and mental health services administration" (SAMSHA), dal provvedimento 18/9/2008 riguardante le analisi su lavoratori con mansioni a rischio e dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

Classe di sostanza	SAHMSA	Provvedimento 18/9/2008	GTFI
Anfetamine e analoghi	500	500	500
Cannabinoidi	50	50	50
Cocaina e metaboliti	150	300	300
Oppiacei e metaboliti	2000	300	300
Metadone	-	300	300
Buprenorfina	-	-	5

consumo diverse presenti nei due paesi, Stati Uniti e Italia. Sarebbe auspicabile che tutti i laboratori utilizzassero gli stessi valori di cut-off e uniformassero le procedure per poter confrontare i risultati delle analisi in tutto il territorio nazionale.

Analisi tossicologiche di conferma

Per definizione, un risultato positivo ottenuto con un'analisi di screening non possiede valenza forense. A questo fine è necessario confermare la positività con una seconda tecnica analitica. Le linee guida redatte dalle maggiori associazioni di Tossicologia Forense nazionali e internazionali (13, 15-17) consentono di identificare quali possano essere le metodiche di conferma e quali debbano essere i parametri e/o i requisiti per poter definire una procedura analitica "metodo di conferma". Infatti, un metodo può essere validato e certificato, ma questo non implica che esso possa essere ritenuto idoneo quale metodo di conferma.

Sia GTFI che la "Society of Forensic Toxicologists" (SOFT) ritengono che le metodiche d'elezione per i metodi di conferma siano le metodiche di separazione cromatografica accoppiate alla spettrometria di massa (GC-MS, LC-MS). Un metodo di conferma deve essere necessariamente basato su principi chimico-fisici diversi da quelli utilizzati per il metodo di screening; inoltre, deve essere dotato di sensibilità e selettività superiori a quelle di un metodo di screening. In particolare, un metodo di conferma deve essere dotato di un limite di rivelazione che sia almeno la metà del valore di cut-off utilizzato per il metodo di screening. Queste tecniche sono le più utilizzate in quanto in grado di identificare le sostanze inequivocabilmente in base a parametri quali tempo di ritenzione, massa molecolare (ione molecolare) e struttura chimica (frammenti ionici). Uno o più standard interni marcati con isotopi stabili devono essere obbligatoriamente usati nei metodi di conferma. Lo standard interno, infatti, conferisce elevata accuratezza sia alla misura del tempo di ritenzione cromatografica, sia alla quantificazione dell'analita. Il GTFI definisce i criteri minimi di identificazione e i rispettivi intervalli di tolleranza per le tecniche di analisi strumentali più diffuse, quali:

- analisi MS in scansione ("full scan", con ionizzazione a impatto elettronico o ionizzazione chimica),
- analisi mediante monitoraggio di ioni specifici ("selected ion monitoring", SIM),
- analisi mediante MS tandem (MS-MS) in modalità di scansione degli ioni prodotto,
- analisi MS-MS in modalità "selected reaction monitoring" (SRM).

Utilizzando tecniche di conferma in MS è consigliato l'impiego del sistema degli "identification points" (IP) adottato con decisione della Commissione Europea 2002/657/EC in attuazione della Direttiva 96/23/EC del Consiglio dell'Unione Europea relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (G.U. Unione Europea L 221, 17/8/2002). Nel caso in cui il metodo di conferma abbia anche obiettivi di quantificazione, oltre ai criteri minimi di identificazione

esso deve soddisfare i criteri minimi di quantificazione. Le tecniche analitiche in MS presentano tuttavia ancora alcuni limiti. I costi molto elevati della strumentazione e la necessità di personale altamente qualificato e con esperienza in ambito chimico-tossicologico per interpretare i risultati, fanno sì che la diffusione di questa tecnologia sia ancora limitata.

NUOVE DROGHE: PROBLEMA SOCIALE E DIFFICOLTÀ DI MONITORAGGIO

Negli ultimi anni, un fenomeno del tutto nuovo ha rivoluzionato l'andamento dei comportamenti giovanili rispetto all'uso di droghe. Come dimostrato dall'osservatorio europeo di monitoraggio sulle sostanze d'abuso, alle sostanze tradizionali (cannabis, cocaina, eroina, anfetamine) si è aggiunta una notevole quantità di nuove molecole prevalentemente sintetiche, cioè costruite in laboratorio (18).

Le "nuove droghe" promettono di aumentare le potenzialità cerebrali, la capacità di apprendimento e memoria, nonché di migliorare le prestazioni fisiche di chi le assume e anche di fornire effetti psichedelici di visioni sensoriali e allucinogene e particolari percezioni e sensazioni emozionali. La loro circolazione è molto rapida in quanto avviene attraverso il web e i numerosi "social network" ben noti ai giovani. E' quindi molto semplice sia venirne a conoscenza che acquistarle, coperti dall'anonimato offerto dalla rete (19). L'estrema facilità di accesso a informazioni relative agli effetti in alcuni casi può anche indurre e incentivare la curiosità verso di esse e quindi il loro uso.

Le "nuove droghe" presenti sul mercato sono moltissime e cambiano rapidamente, sia in base alla domanda dei consumatori, sia in base alle attività di controllo e contrasto anche normativo operato nei vari Paesi. L'inserimento precoce nelle tabelle delle sostanze stupefacenti risulta, quindi, fondamentale anche per consentire l'azione di contrasto da parte delle Forze dell'Ordine che, altrimenti, non potrebbero sequestrare i composti tossici e svolgere un'efficace azione di prevenzione. L'ampia disponibilità e la facile reperibilità di queste sostanze è certamente un grave problema sia sociale che sanitario, poiché le sostanze psicoattive così liberamente messe a disposizione espongono le giovani generazioni, che ne fanno largo uso, a rischi di intossicazioni più o meno gravi, che possono portare anche alla morte e, in ogni caso, a problemi cognitivi etico-comportamentali, fino a problemi neurologici. Tali rischi sono dovuti anche a informazioni per lo più non accurate fornite ai consumatori e alla difficoltà di fare diagnosi.

CONSUMO E ABUSO DI ALCOL

Aspetti clinici ed epidemiologici

L'alcol è il terzo fattore di morte e disabilità nella popolazione adulta. In Italia, oltre 750.000 soggetti sono forti consumatori (consumo dannoso/alcol dipendenti)

(20). Il rischio di danno aumenta in modo significativo per dosaggi >10-20 g/die (21). Il rischio alcol-correlato, pertanto, inizia già a bassi dosaggi (Tabella 3). Il DSM-5 ha unito i termini abuso (consumo dannoso) e dipendenza introducendo il termine di disordini alcol-correlati o "alcohol use disorders" (AUD) (9).

Vengono favorite ~60 differenti patologie. I sistemi maggiormente coinvolti sono l'apparato cardiovascolare, il sistema nervoso e la componente epato-gastroenterologica. Etanolo e acetaldeide, inoltre, hanno un rapporto causale con il cancro (Gruppo 1 – IARC/OMS) (22). Le neoplasie alcol-correlate insorgono soprattutto in cavità orale, faringe, laringe, esofago, fegato, intestino e mammella.

80% dei decessi per patologia epatica e 50% di quelli per cirrosi sono da attribuire al consumo di alcol. Nel ~30-40% dei casi vi è un'associazione con il virus dell'epatite C (HCV). Il 60-100% dei bevitori sviluppa steatosi epatica, 20-40% di questi evolve a steatoepatite e ~20-40% a cirrosi epatica. L'epatocarcinoma (HCC) ha un'incidenza del 3%/anno di tutti i casi di tumore. In caso di scompenso epatico o di insorgenza di HCC in fase precoce (un nodulo <5 cm o 3 noduli tumorali di diametro <3 cm) è indicato il trapianto di fegato (LT). L'"European liver transplant registry" ha dichiarato come l'alcol rappresenti la seconda causa di LT, dopo l'epatite da virus B e C (23).

Nonostante l'alcol rappresenti una causa importante di LT e nonostante i dati di sopravvivenza a 5 anni dimostrino come siano sovrapponibili o in alcuni casi addirittura superiori ad altre cause, alcuni autori hanno sollevato alcuni problemi di ordine etico. In particolare, è diffusa l'opinione che l'epatopatia alcol-correlata sia una patologia "autoinflitta", di cui il soggetto ha responsabilità diretta e quindi la donazione di un organo dovrebbe essere effettuata solo in presenza di garanzie assolute. E' stato tuttavia stimato come ~95% dei soggetti affetti da AUD non venga valutato per un eventuale LT. In realtà la possibilità di ricaduta post-trapianto è decisamente inferiore rispetto alla possibilità di recidiva da epatite da virus C o di altre patologie (23). Attualmente la maggior parte dei centri trapianto, sia europei che statunitensi, richiede un periodo minimo di astensione di ~6 mesi: questo periodo può comportare, però, il decesso di numerosi pazienti prima dell'intervento. Vi sono casi, infatti, con cirrosi in progressivo peggioramento [con un punteggio "model for end-stage liver disease" (MELD) >19] (24) o casi di epatite acuta severa (EAS) (MELD >21, Maddrey DF >32) (25), che difficilmente possono sopravvivere per un periodo >3 mesi. Un documento italiano sul tema ha suggerito come nei casi di scompenso epatico rapidamente progressivo il periodo di astensione possa essere 3 mesi e in caso EAS l'inserimento in lista possa essere immediato, naturalmente attraverso un'attenta selezione dei pazienti. Negli altri casi (MELD <19), i 6 mesi possono essere rispettati (23). La valutazione dell'astensione dall'uso di alcol viene effettuata con la determinazione della transferrina carboidrato carente (CDT) (sino a 2 settimane) e con l'etilglucuronide (EtG) urinaria (fino a

Tabella 3

Consumo di bevande alcoliche e gradazione del rischio in un soggetto sano

Quantità	Livello di rischio
3-5 g/die	Minimo
Donna <10 g/die	Basso
Uomo <20 g/die	
Donna 11-40 g/die	Medio
Uomo 21-60 g/die	
>65 anni e fra 18 e 25 anni 12 g/die	
Donna >40 g/die	Danno e/o dipendenza
Uomo >60 g/die	
"Binge drinking"	

80 ore). La valutazione migliore è certamente la misura di EtG nel capello con una possibile finestra di rilevamento di ~6 mesi (26), anche se alcuni trattamenti cosmetici possono causare falsi negativi (27).

Diagnosi di consumo acuto di alcol

Il consumo di alcol induce un quadro clinico con effetti negativi proporzionali al livello di concentrazione di etanolo nel sangue (Tabella 4). L'etanolo è assorbito rapidamente nello stomaco e nell'intestino in un tempo che può variare da 15 a 40 min in relazione al quantitativo di cibo presente nello stomaco stesso. Date le piccole dimensioni della molecola, l'etanolo viene rapidamente diffuso in tutti i tessuti. Inoltre, esso è in grado di superare la membrana ematoencefalica e la placenta. Una quota compresa tra 95% e 98% va incontro a processi di metabolismo ossidativo a opera dell'enzima aldeide deidrogenasi e del sistema microsomiale di ossidazione dell'etanolo, per mezzo dei quali l'etanolo è convertito ad acetaldeide. ~2% dell'etanolo ingerito è escreto immodificato attraverso urine, sudore, saliva ed espirato. Una piccola percentuale, infine, compresa tra 0,02-0,06% subisce un metabolismo non ossidativo, che porta alla formazione di etilglucuronato e etilsolfato.

La concentrazione di etanolo ematico correla con quella riscontrata nella saliva e nell'espirato, mentre il picco di massima concentrazione è ritardato di 60 min nell'urina e di 30-120 min nel sudore (28, 29).

Nel tempo sono state sviluppate numerose procedure analitiche per la determinazione dell'etanolo nei fluidi biologici. L'appropriatezza della matrice insieme all'accuratezza delle metodiche sono di fondamentale importanza, dal momento che i risultati quantitativi determinano l'esito clinico e/o medico legale della richiesta. Le metodiche enzimatiche, basate sul monitoraggio della formazione di NADH per l'analisi dell'etanolo su siero, plasma o urina possono essere effettuate come screening o essere utilizzate a sola valenza clinica. In questi casi i possibili interferenti sono da ricercarsi nella cross-reattività con altri alcol tossici e/o

Tabella 4*Principali sintomi correlati alle diverse concentrazioni di alcolemia*

Concentrazione (g/L)	Sensazioni più frequenti	Effetti progressivi e abilità compromesse
Assente	Nessuna	Nessuna
0,1-0,2	Iniziale sensazione di ebbrezza Iniziale riduzione delle inibizioni e del controllo	Affievolimento della vigilanza, attenzione e controllo Iniziale riduzione del coordinamento motorio Iniziale riduzione della visione laterale Nausea
0,3-0,4	Sensazione di ebbrezza Riduzione delle inibizioni, del controllo e della percezione del rischio	Riduzione delle capacità di vigilanza, attenzione e controllo Riduzione del coordinamento motorio e dei riflessi Riduzione della visione laterale Vomito
0,5-0,8	Cambiamenti dell'umore Nausea, sonnolenza Stato di eccitazione emotiva	Riduzione della capacità di giudizio Riduzione della capacità di individuare oggetti in movimento e della visione laterale Riflessi alterati Alterazione delle capacità di reazione agli stimoli sonori e luminosi Vomito
0,9-1,5	Alterazione dell'umore Rabbia Tristezza Confusione mentale Disorientamento	Compromissione della capacità di giudizio e di autocontrollo Comportamenti socialmente inadeguati Linguaggio mal articolato Alterazione dell'equilibrio Compromissione della visione, della percezione di forme, colori, dimensioni Vomito
1,6-3,0	Stordimento Aggressività Stato depressivo Apatia/letargia	Compromissione grave dello stato psicofisico Comportamenti aggressivi e violenti Difficoltà marcata a stare in piedi o camminare Stato di inerzia generale Ipotermia Vomito
3,1- 4,0	Stato di incoscienza	Allucinazioni Cessazione dei riflessi Incontinenza Vomito Coma con possibilità di morte per soffocamento da vomito
>4	Difficoltà di respiro Sensazione di soffocamento Sensazione di morire	Battito cardiaco rallentato Fame d'aria Coma Morte per arresto respiratorio

alla presenza di altri substrati ed enzimi che possono anch'essi generare NADH (30). Per garantire risultati accurati è bene tenere presente le finalità della richiesta e quegli avvertimenti che inducono a considerare criticamente i risultati ottenuti, in particolare valori di etanolemia che non correlano con le condizioni cliniche del soggetto, oppure una concentrazione di etanolo nel sangue che non diminuisca di almeno 0,2 g/L per ora.

Diagnosi di consumo cronico di alcol

Gli esami di laboratorio proposti per il riconoscimento dell'abuso alcolico cronico sono numerosi. I marcatori biochimici tradizionali usati per identificare l'esposizione cronica all'alcol sono γ -glutamilttransferasi (γ GT), aspartato e alanina aminotransferasi (AST e ALT) e volume corpuscolare medio degli eritrociti (MCV) (31). Altri marcatori introdotti più recentemente sono CDT, EtG

e fosfatidiletanolo (PEth).

Una limitazione di queste determinazioni è che esse identificano principalmente forti consumatori di alcol per considerevoli periodi di tempo (mesi-anni) e pertanto hanno una bassa sensibilità per il consumo cronico recente. Un altro svantaggio è che esse mostrano bassa specificità, poiché possono aumentare anche in altre circostanze quali assunzioni di farmaci, come barbiturici e antiepilettici, fumo, obesità e gravidanza, oltre che per la maggior parte delle patologie epatiche anche di origine non alcolica. Per la loro bassa specificità, l'utilizzo di questi marcatori convenzionali del consumo cronico di alcol pone dei limiti nello screening di popolazione, mentre sono più utili nel "follow-up" del soggetto con patologia epatica alcol-dipendente già diagnosticata.

La transferrina, principale proteina che veicola il ferro, è sintetizzata e secreta dal fegato con una emivita di 7-10 giorni. È una glicoproteina a una struttura a singola

catena e presenta una complessa eterogeneità strutturale. Ciò è dovuto alla possibilità di un differente carico dei siti che legano il ferro, alla complessità della catena glucidica, al numero di residui terminali di acido sialico e all'esistenza di varianti genetiche della catena polipeptidica. L'eccessivo consumo di alcol può danneggiare la sintesi, la secrezione e l'assemblaggio delle glicoproteine con conseguente ridotta incorporazione di residui di acido sialico. Le due principali isoforme della CDT sono la disialotransferrina e la asialotransferrina. La disialotransferrina ha la forma di una catena biantennata con due residui di acido sialico, mentre l'asialotransferrina non ha alcuna catena oligosaccaridica. La desialazione della transferrina richiede quantità abbastanza alte di etanolo assunte *in vivo*. Individui che hanno bevuto almeno 50-80 g di etanolo al giorno come media in due o più settimane precedenti spesso mostrano un aumento della CDT (32-36).

La glicofoma della transferrina predominante è la tetrasialotransferrina (>80%). Le glicofome diagnosticamente più importanti sono invece l'asialotransferrina e la disialotransferrina; quest'ultima aumenta negli alcolisti moderati, mentre l'asialotransferrina è rilevabile solamente nei forti bevitori (37). Pertanto il marcatore più sensibile resterebbe la disialotransferrina, anche se il più specifico è senz'altro l'asialotransferrina.

Per la determinazione della CDT sono disponibili metodi immunometrici e metodi separativi, quali elettroforesi capillare zonale (CZE) e HPLC. I problemi di standardizzazione dei metodi e delle procedure per la misura della CDT sono stati affrontati dal gruppo di lavoro IFCC, che ha definito la molecola da misurare (la percentuale di disialotransferrina rispetto alla transferrina totale), ha messo a punto un metodo di riferimento in HPLC e preparato il materiale di riferimento ottenuto da campione umano (non per aggiunta), utilizzabile per calibrare tutte le tecniche analitiche (38).

EtG è un metabolita diretto dell'alcol: infatti, una piccola frazione (0,02-0,06%) della dose ingerita di alcol viene coniugata con acido glucuronico per produrre EtG, un metabolita solubile in acqua e quindi escreto nelle urine (39). Esiste un metodo immunometrico automatico validato per urine fresche (40); tuttavia, la tecnologia d'elezione è HPLC/MS-MS con differenti preparazioni e colonne, utilizzabile per tutti i fluidi biologici e i tessuti.

L'EtG può essere ritrovato in numerosi fluidi biologici, tessuti e capelli anche dopo qualche giorno dall'assunzione di alcol. La misura su urine può dare risultati falsi negativi dovuti alla diluizione urinaria per eccessivo introito di liquidi o per la degradazione da batteri contenuti nelle urine. Falsi positivi invece possono derivare da neosintesi in presenza di glicosuria e *Candida*, che producono etanolo *in vivo*. Inoltre, EtG potrebbe risultare positivo anche in caso di assunzioni di medicinali e uso di colluttori contenenti alcol. Per tutte queste ragioni, SAMSHA sconsiglia l'utilizzo dell'EtG urinario per usi legali o disciplinari (41).

EtG si accumula anche nella matrice cheratinica;

tuttavia, nessuna correlazione è stata trovata tra la quantità di alcol assunta e la concentrazione di EtG rinvenuta nei capelli.

PEth è un fosfolipide anomalo sintetizzato solo in presenza di etanolo attraverso l'azione della fosfolipasi D sulla fosfatidilcolina (42). Una singola assunzione di alcol non è sufficiente alla formazione di PEth; quindi, rispetto ad altri marcatori, può essere individuabile nei campioni biologici soltanto dopo diverse assunzioni e rimane identificabile per più di due settimane (43, 44).

A oggi non esiste un biomarcatore ideale che garantisca sensibilità e specificità massime e pertanto per aumentare l'accuratezza diagnostica devono essere utilizzati pannelli comprendenti più biomarcatori. Utilizzare matrici differenti (sangue, urine, capelli) e marcatori differenti (CDT, EtG, PEth) anche ripetuti nel tempo è, attualmente, la strategia maggiormente applicata, in quanto permette un miglior inquadramento del problema e una maggior fruibilità dei dati per la diagnosi e la cura dei soggetti con problemi alcol-correlati (45, 46).

ART. 186 E 187 DEL CODICE DELLA STRADA ED ESAMI TOSSICOLOGICI

L'introduzione del nuovo reato di omicidio stradale e di lesioni colpose stradali gravi e gravissime (L 23/03/2016 n. 41, art. 589 bis e 590 bis) rende necessario fare chiarezza sulle procedure di accertamento dello stato di ebbrezza e di alterazione da assunzione di droghe. Le pene previste sono particolarmente severe, soprattutto se lo stato di ebbrezza rientra nella previsione dell'art. 186 comma 2 lettera C del Codice della strada (CdS) oppure nel caso in cui chi ha causato l'incidente fosse in stato di alterazione conseguente all'assunzione di droga o di altre sostanze psicotrope. In questi casi è previsto l'arresto obbligatorio in flagranza ed è ammesso anche il fermo di polizia giudiziaria (PG) (Figura 1). Gli accertamenti tossicologici devono necessariamente essere eseguiti in modo rigoroso, sulla base di linee guida che possono, nei limiti del possibile, codificare a livello nazionale le procedure, eliminando incertezze interpretative e uniformando la giurisprudenza, così da evitare disparità di trattamento.

Il giudizio tossicologico-forense si riferisce fondamentalmente alle analisi del sangue; solo in caso di presenza nel sangue di alcol e/o stupefacenti farmacologicamente attivi si sancisce lo stato di alterazione psico-fisica. La presenza nel sangue di stupefacenti immoificati (oltre che di metaboliti spesso inattivi) è la prova dell'effetto disabilitante in atto al momento del prelievo.

La legge stabilisce che nei casi di omicidio stradale e di lesioni personali stradali gravi o gravissime, di cui agli art. 589-bis e 590-bis C.P., qualora il conducente si rifiuti di sottoporsi agli accertamenti atti a verificare lo stato di ebbrezza o di alterazione correlata all'uso di sostanze stupefacenti o psicotrope, la PG può chiedere al Pubblico Ministero (PM) di autorizzarla a effettuare un prelievo coattivo. Il PM, nei casi d'urgenza, può disporre

commi		OMICIDIO STRADALE	LESIONI PERSONALI STRADALI	
			Gravi	Gravissime
1	Condotta colposa con violazione delle norme sulla circolazione stradale.	Da 2 a 7 anni	Da 3 mesi a 1 anno	Da 1 a 3 anni
2	Condotta colposa realizzata alla guida di un veicolo a motore in ipotesi di 186 co. 2 lett. c) ($\geq 1,5$ g/l) e 187 C.d.s. (stup.)	Da 8 a 12 anni	Da 3 a 5 anni	Da 4 a 7 anni
3	AGG: Guidatore appartenente a particolari categorie (taxi, ncc, autotrasportatori, autisti ecc) in ipotesi di 186 co. 2 lett. b) (tra 0,8 e 1,5 g/l)	Da 8 a 12 anni	Da 3 a 5 anni	Da 4 a 7 anni
4	AGG: Chiunque , in ipotesi di 186 co. 2 lett b) (tra 0,8 e 1,5 g/l)	Da 5 a 10 anni	Da 1 anno e 6 mesi a 3 anni	Da 2 a 4 anni
5	AGG: - Velocità $\geq 2x$ limite e ≥ 70 km/h - Semaforo rosso / circola contromano - Inversione pericolosa	Idem comma 4	Idem comma 4	
6	AGG: reato commesso da guidatore senza patente, patente sospesa, revocata, ovvero veicolo senza RCA (se di proprietà).	+ fino a 1/3	+ fino a 1/3	
7	ATT: concorso di colpa	- fino a 1/2	- fino a 1/2	
8	Violazioni plurime	Violazione più grave aumentata fino al triplo (max 18 anni)	Violazione più grave aumentata fino al triplo (max 7 anni)	
589ter 590ter	AGG: Fuga	+ da 1/3 a 2/3 (min. 5 anni)	+ da 1/3 a 2/3 (min. 3 anni)	

Omicidio e Lesioni stradali (589bis e 590bis c.p.)
Schema riepilogativo delle pene*

*Le condotte incriminate e la numerazione dei commi sono identiche per entrambi i reati.

Figura 1

Omicidio stradale: schema riepilogativo delle nuove sanzioni penali.
AGG, aggravante; ATT, attenuante.

l'esecuzione del prelievo anche oralmente e solo successivamente confermarlo per iscritto. Il provvedimento è sottoposto, comunque, alla convalida del giudice. Del decreto con cui è disposto l'accertamento coattivo deve essere data tempestiva notizia al difensore dell'interessato, che ha facoltà di assistervi. L'esecuzione coattiva del prelievo deve essere tecnicamente possibile, altrimenti per il sanitario si può prefigurare l'ipotesi di reato di violenza privata. Se l'accertamento non è stato possibile, nel verbale dovranno essere indicati i motivi che l'hanno reso impossibile o sconsigliabile, eventualmente allegando la documentazione o la certificazione sanitaria compilata e sottoscritta dal sanitario incaricato dell'accertamento. L'interpretazione della norma tuttavia non è uniforme in quanto non è esplicitato il prelievo di sangue (la norma fa riferimento a capelli, peli o mucosa orale). Inoltre, esiste una disparità di trattamento a seconda che gli accertamenti tossicologici siano richiesti dalle Forze dell'Ordine alla struttura sanitaria oppure siano eseguiti per ragioni diagnostiche e di cura. Nel primo caso l'interessato deve essere avvisato che può farsi assistere da un legale e che può rifiutarsi di sottoporsi al prelievo di sangue. Nel secondo caso tali garanzie non sono previste, in quanto l'esito degli accertamenti può essere utilizzato in sede processuale, anche senza il consenso dell'interessato.

La misura della concentrazione alcolica nell'aria espirata mediante etilometro è il metodo di accertamento utilizzato già sul luogo del fermo dagli organi di Polizia Stradale. Si effettuano due misurazioni a distanza di 5 min e la concentrazione di alcol presente nell'aria

espirata viene trasformata nella corrispondente concentrazione ematica. In pochi minuti il risultato del test è noto e ha valore legale. L'accertamento della positività può essere effettuato anche mediante il prelievo di sangue presso le strutture ospedaliere. La determinazione su plasma/siero oppure su sangue intero è argomento di discussione. E' dimostrato che la concentrazione plasmatica e la concentrazione su sangue intero di alcol etilico non sono equivalenti poiché l'alcol etilico si distribuisce nelle diverse componenti ematiche in relazione al diverso contenuto acquoso. Considerando che il siero contiene un quantitativo di acqua >12-18% rispetto al sangue intero, risulta che la concentrazione di alcol etilico su siero (o plasma) è sempre maggiore rispetto alla concentrazione su sangue.

L'analisi enzimatica eseguita su campione di siero o plasma, oltre a fornire un risultato sovrastimato, è da considerarsi metodo di screening, dal momento che l'enzima utilizzato per la reazione (alcol deidrogenasi) e le modalità di rivelazione dell'avvenuta reazione sono caratterizzati da insufficiente selettività analitica. La tecnica di elezione per la determinazione accurata dell'alcolemia su campione di sangue intero è la gascromatografia dello "spazio di testa" (13).

L'accertamento dello stato di ebbrezza alcolica è il meno problematico in quanto esiste una relazione lineare tra concentrazione ematica e effetto sul sistema nervoso centrale e concentrazioni ematiche crescenti corrispondono a maggiori effetti disabilitanti. L'art. 186 e 186 bis del CdS stabilisce una graduazione delle sanzioni al crescere della concentrazione (da 0,5 a 0,8

g/L, violazione amministrativa; da 0,8 a 1,5 g/L, sanzioni penali, >1,5 g/L conseguenze penali e accessorie più gravi). Le ultime due ipotesi sono aggravanti dell'omicidio stradale e delle lesioni colpose gravi o gravissime.

Per gli stupefacenti invece non c'è ancora consenso sui cut-off ematici da adottare per definire la non idoneità alla guida (47). La norma stabilisce che il conducente non deve assumere sostanze stupefacenti. Pertanto la presenza di stupefacenti voluttuari attivi nel sangue, in concentrazioni "correttamente" misurabili, dovrebbe essere sufficiente a costituire di per sé un'evidenza di guida sotto l'influenza di sostanze psicoattive. Tuttavia, vista la gravità delle sanzioni previste dalla nuova normativa, sarebbe auspicabile che linee guida autorevoli definissero le concentrazioni ematiche di sostanze psicoattive correlate alla disabilità alla guida come per l'alcolemia. La definizione di cut-off "legali" e di protocolli standardizzati nazionali e internazionali sono indispensabili per garantire al cittadino lo stesso trattamento.

GESTIONE DELLE EMERGENZE TOSSICOLOGICHE IN MEDICINA DI LABORATORIO

Il laboratorio di tossicologia analitica clinica che opera a supporto del paziente intossicato si occupa del rilievo, identificazione e dosaggio di xenobiotici in campioni biologici. Il dato di laboratorio ha valenza di diagnosi, prognosi, indicazione al trattamento terapeutico, prova documentale per casi di interesse medico-legale, nonché di ricerca, relativamente allo

studio di parametri di tossicocinetica, correlazione tra effetti tossici e concentrazioni del composto in matrici biologiche, valutazione dell'efficacia di trattamenti terapeutici di tipo farmacologico/antidotico/depurativo.

Requisiti indispensabili per un laboratorio di tossicologia analitica d'urgenza sono la tempestività/continuità del servizio erogato (h24, 365 giorni/anno), con disponibilità di strumentazione e personale specializzato, al fine di poter controllare un ampio numero di analiti potenziali cause di intossicazioni.

La scelta di quali esami eseguire in urgenza dovrebbe basarsi su diversi criteri quali: rilevanza clinica dell'intossicazione, impatto del dato tossicologico sulla gestione del soggetto intossicato, complessità analitica della determinazione, epidemiologia territoriale dell'intossicazione. In realtà, è la metodologia analitica che indirizza e limita il supporto diagnostico del laboratorio. Le tecniche analitiche attualmente disponibili per le analisi farmaco-tossicologiche comprendono metodi immunochimici ed enzimatici, facilmente attivabili presso molti ospedali che dispongono di laboratorio analisi, e tecniche che prevedono strumentazione più complessa e costosa (ad es., tecniche cromatografiche abbinate a vari sistemi di rivelazione, quali UV, MS), di competenza di laboratori specializzati. Linee guida internazionali (48, 49), anche in funzione della complessità delle metodiche analitiche, propongono un elenco di esami da eseguire presso tutti gli ospedali che ricoverano soggetti intossicati: ad es., etanolo, paracetamolo, litio, digossina, salicilati, antiepilettici, quali fenitoina, fenobarbitale, valproato, carbamazepina. Un secondo elenco di determinazioni,

Tabella 5

Casistica del Laboratorio di Tossicologia Analitica, IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, per l'anno 2015, relativamente alle analisi eseguite in urgenza

Analita/classe	No.	Utenza interna	Utenza esterna (ospedali Lombardia e altre regioni)	Tecnica analitica
Psicofarmaci (screening)	153	69 (45%)	84 (55%)	LC-UV, LC-MS, GC-MS
Metformina	81	9 (11%)	72 (89%)	LC-UV
Colchicina	14	0	14 (100%)	LC-MS
Farmaci diversi, analisi mirata (metodo cromatografico)	356	223 (63%)	133 (37%)	LC-UV, LC-MS
Farmaci diversi, analisi mirata (metodo immunochimico)	113	70 (62%)	43 (38%)	Immunochimica
Etanolo	219	188 (86%)	31 (14%)	Enzimatica
Stupefacenti "classici"	1223	971 (80%)	252 (20%)	Immunochimica
Nuove sostanze psicoattive d'abuso (screening)	85	11 (13%)	74 (87%)	LC-MS, GC-MS
Glicole etilenico	49	2 (4%)	47 (96%)	LC-UV
Metanolo	38	2 (5%)	36 (95%)	GC-MS
Pesticidi	13	3 (23%)	10 (77%)	LC-UV, GC-MS

LC-UV, cromatografia liquida-spettrofotometria UV; LC-MS, cromatografia liquida-spettrometria di massa; GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa.

eseguibili con tecniche cromatografiche e/o MS sono di pertinenza di laboratori specializzati: ad es., metanolo, glicole etilenico, metalli.

Nella Tabella 5 è riportata la casistica relativa agli esami farmaco-tossicologici eseguiti in urgenza ("turnaround time" di 1-4 ore) nel 2015 dal Laboratorio di Tossicologia Analitica, IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, su richiesta dei reparti e di ospedali situati su tutto il territorio nazionale (50-52). L'esempio evidenzia la necessità di rispondere a richieste di analisi per un ampio spettro di xenobiotici potenzialmente tossici, buona parte dei quali non sono analizzabili con i più comuni e diffusi metodi immunochimici ed enzimatici.

Appare quindi fondamentale che, nell'ambito della pianificazione dei servizi d'emergenza medica, siano previsti laboratori di tossicologia specializzati, di dimensione regionale o sovraregionale, a supporto di quelli di base.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Plenk JJ. *Elementa medicinae et chirurgiae forensis*. Vienna: Graeffer, 1781.
2. Guareschi I. *Introduzione allo studio degli alcaloidi*. Torino: Unione Tipografica Editrice, 1892.
3. Dall'Olio G. L'analisi chimico-tossicologica degli alcaloidi nell'Ottocento. *LigandAssay* 2009;14:308-14.
4. Sertürmer FW. Analyse de l'opium. De la morphine e de l'acide méconique, considérées comme parties essentielles de l'opium. *Annales de Chimie et de Physique* 1817;5:21-42.
5. Guareschi I. Francesco Selmi e la sua opera scientifica. *Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino* 1912;42:125-268.
6. Dall'Olio G. Una importante scoperta chimico-tossicologica dell'Ottocento: le ptomaine. In: Dorizzi RM, Dall'Olio G, eds. *Classici della Medicina di Laboratorio* (2). Torino: GET, 1999;155-60.
7. Selmi F. Di alcuni criteri per la ricerca degli alcaloidi vegetali in differenza delle ptomaine. Bologna: Zanichelli, 1880.
8. Fenton JJ. History of toxicology. In: Fenton JJ, ed. *Toxicology: a case-oriented approach*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.
9. American Psychiatric Association. *DSM-5. Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali*. V ed. Milano: Raffaello Cortina Editore, 2014.
10. http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=3729&area=sostanzeStupefacenti&menu=vuoto
11. Pichini S, Marchei E, Palmi I, et al. *Smart drugs*, 2^a ed. Roma: Dipartimento del Farmaco - Osservatorio Fumo Alcol e Droga, Istituto Superiore di Sanità, 2010.
12. Blanco C, Campbell AN, Wall MM, et al. Toward national estimates of effectiveness of treatment for substance use. *J Clin Psychiatry* 2017;78:e64-70.
13. GTFI. *Linee guida per strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali*. Revisione n. 4 del 6 dicembre 2012. <http://www.gtfi.it/wp-content/uploads/2015/07/LG2012.pdf>
14. Armbruster DA, Schwarzhoff RH, Hubster EC, et al. Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs-of-abuse screening. *Clin Chem* 1993;39:2137-46.
15. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). <https://www.samhsa.gov/>
16. http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf
17. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. <http://www.swgtox.org/>
18. EMCDDA-EUROPOL, 2015. <http://www.emcdda.europa.eu>
19. Schepis TS, Marlowe DB, Forman RF. The availability and portrayal of stimulants over the Internet. *J Adolesc Health* 2008;42:458-65.
20. Scafato E, Gandin C, Galluzzo L, et al. *Epidemiologia e monitoraggio alcol-correlato in Italia*. Roma: Rapporti ISTISAN, Istituto Superiore di Sanità, 2016.
21. Connor JP, Haber PS, Hall WD. Alcohol use disorders. *Lancet* 2016;387:988-98.
22. IARC (World Health Organization). A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2012;100E:377-503.
23. Testino G, Burra P, Bonino F, et al. Acute alcoholic hepatitis, end stage alcoholic liver disease and liver transplantation: an Italian position statement. *World J Gastroenterol* 2014;20:14642-51.
24. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-70.
25. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, et al. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193-9.
26. Stauffer K, Yegles M. Biomarkers for detection of alcohol consumption in liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2016;22:3725-34.
27. Gareri J, Rao C, Koren G. Examination of sex differences in fatty acid ethyl ester and ethyl glucuronide hair analysis. *Drug Test Anal* 2014;6(suppl 1):30-6.
28. Jones AW, Kugelberg FC. Relationship between blood and urine alcohol concentrations in apprehended drivers who claimed consumption of alcohol after driving with and without supporting evidence. *Forensic Sci Int* 2010;194:97-102.
29. Dumett M, Rosen G, Sabat J, et al. Deconvolving an estimate of breath measured blood alcohol concentration from biosensor collected transdermal ethanol data. *Appl Math Comput* 2008;196:724-43.
30. Nine JS, Moraca M, Virji M, et al. Serum-ethanol determination: comparison of lactate and lactate dehydrogenase interference in three enzymatic assay. *J Anal Tox* 1995;19:192-6.
31. Chick J, Kreitman N, Plant M. Mean cell volume and gamma-glutamyltransferase as markers of drinking in working men. *Lancet* 1981;1:1249-51.
32. Scouller K, Conigrave KM, Macaskill P, et al. Should we use carbohydrate-deficient transferrin instead of gamma-glutamyltransferase for detecting problem drinkers? A systematic review and meta-analysis. *Clin Chem* 2000;46:1894-902.
33. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37:2029-37.
34. Salaspuro M. Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol* 1999;19:261-71.
35. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin a markers of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis,

- analysis and interpretation. *Clin Chem* 2001;47:13-27.
36. Sillanaukee P, Strid N, Allen JP, et al. Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:34-40.
 37. Legros FJ, Nuyens V, Baudoux M, et al. Use of capillary zone electrophoresis for differentiating excessive from moderate alcohol consumption. *Clin Chem* 2003;49:440-9.
 38. Bianchi V, Pacifici R, Palmi I, et al. Transferrina carboidrato-carente (CDT): strategie analitiche ed interpretative. *Biochim Clin* 2010;34:128-38.
 39. Dahl H, Stephanson N, Beck O, et al. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethylglucuronide. *J Anal Toxicol* 2002;26:201-4.
 40. Bottcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of new immunoassay for urinary EtG testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8.
 41. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). The role of biomarkers in the treatment of alcohol use disorders, 2012 revision. SAMHSA Advisory 2012;11:1-8.
 42. Schröck A, Pfäffli M, König S, et al. Application of phosphatidylethanol (PEth) in whole blood in comparison to ethyl glucuronide in hair (hEtG) in driving aptitude assessment (DAA). *Int J Legal Med* 2016;130:1527-33.
 43. Varga A, Hansson P, Lundqvist C, et al. Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1832-7.
 44. Aradottir S, Asanovska G, Gjerds S, et al. Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 2006;41:431-7.
 45. Helander A, Peter O, Zheng Y. Monitoring of the alcohol biomarkers PEth, CDT and EtG/EtS in an outpatients treatment setting. *Alcohol Alcohol* 2012;5:552-7.
 46. Bianchi V, Premaschi S, Raspagni A, et al. A comparison between serum carbohydrate-deficient transferrin and hair ethyl glucuronide in detecting chronic alcohol consumption in routine. *Alcohol Alcohol* 2015;50:266-70.
 47. Busardò FP, Pichini S, Pacifici R. Driving under the influence of drugs: looking for reasonable blood cutoffs and realistic analytical values. *Clin Chem*. 2017;63:781-3.
 48. Wu AHB, McKay C, Broussard L A. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Recommendations for the use of laboratory tests to support poisoned patients who present to the emergency department. *Clin Chem* 2003;49:357-79.
 49. Thompson J P, Watson I D, Thanacoody HKR. Guidelines for laboratory analyses for poisoned patients in the United Kingdom. *Ann Clin Biochem* 2014;51:312-25.
 50. Papa P, Rolandi L, Rocchi L, et al. Diagnosi analitica d'urgenza per overdose da farmaci, sostanze d'abuso e altri composti in laboratori dedicati. XVI Congresso Nazionale Società Italiana Tossicologia (SITOX), 2012. http://congresso.sitox.org/archivio/2012/congresso_abs_view.php?id=137
 51. Papa P, Rocchi L, Rolandi L, et al. Ricerca e identificazione di nuove sostanze psicoattive in casi di sospetta intossicazione in Italia. *Italian J Addiction* 2014;1:50-6.
 52. Vecchio S, Giampreti A, Petrolini VM. Metformin accumulation: lactic acidosis and high plasmatic metformin levels in a retrospective case series of 66 patients on chronic therapy. *Clin Toxicol* 2014;52:129-35.

Espressione e valore prognostico del ciclo cellulare e delle aneuploidie nel mieloma multiplo e nella gammopatia monoclonale di significato indeterminato

Ilaria Sanzio Colloca, Marilena Caldarella, Lucia D'Amelio, Rosaria Amodeo, Francesco Gervasi

U.O. Laboratorio Specialistico di Oncologia, Dipartimento Strutturale di Medicina di Laboratorio, Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione (ARNAS) Civico, Di Cristina e Benfratelli, Palermo

ABSTRACT

Expression and prognostic value of cell cycle and aneuploidy in multiple myeloma (MM) and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). In this study, we used multiparameter flow cytometry (MFC) to investigate old and new plasma cell (PC) markers, such as the extrusion pumps of drugs, cluster of differentiation 243 (CD243) and citochemokine receptors (CD197, CD191, CD192, CD196, CD183, CD184, CD126) involved in cellular interactions, locomotion, adhesion and invasion. We studied the different expression of PC in 55 samples of bone marrow of patients affected by MM and MGUS, using MFC and immunomagnetic sorting. The incidence and prognostic significance of the analysis of the cell cycle and aneuploidy were evaluated in order to support the efficacy of MFC. By analysing the immunophenotypic receptor molecules expression and extrusion pumps, we found that CD243, CD192, CD183, CD191 and CD196 showed increased expression in cases of MM, whereas an increased expression of CD197, CD184 and CD126 emerged in MGUS samples. In comparing neoplastic and normal PC in MM samples, we found an increased expression of all receptors on the surface of neoplastic PC. Cell cycle and aneuploidy analysis of all samples showed a pseudodiploid condition with a more difficult prognosis, even considering the old age of patients.

INTRODUZIONE

Il mieloma multiplo (MM) è un disordine delle plasmacellule (PCs), caratterizzato dalla proliferazione di cloni di PCs aberranti nel midollo osseo, di solito preceduto da una fase pre-maligna nota come gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) (1). Nella diagnosi di MGUS e di MM e nel monitoraggio della malattia minima residua (mmR) si utilizza anche la citometria a flusso multiparametrica (MFC) (2, 3), che permette:

- la caratterizzazione immunofenotipica di PCs clonali differenziandole dalle normali;
- l'elaborazione di considerazioni prognostiche;
- lo studio delle altre popolazioni cellulari del campione (4).

La trasformazione da MGUS a MM dipende da due componenti: le alterazioni geniche e i cambiamenti nel microambiente midollare. Le prime sono rappresentate da traslocazioni, che coinvolgono principalmente il cromosoma 14, e da mutazioni o delezioni dei cromosomi 13 e/o 17. Nel microambiente midollare, invece, le cellule

stromali, endoteliali e ossee rilasciano citochine e chemochine che trovano i propri recettori sulle PCs creando un "cross-talk" tale da far aderire le PCs mielomatose alle nicchie midollari creando le condizioni favorevoli allo sviluppo della patologia. Interleuchina 6 (IL6), interleuchina 1 β (IL1 β), interleuchina 3 (IL3), fattore di necrosi tumorale (TNF) α , fattore di crescita trasformante β (TGF1 β) e Dickkopf 1 (DKK) sono le principali citochine coinvolte in questo "cross-talk" tra PCs neoplastiche e microambiente midollare. I recettori citochemochinici, espressi sulla superficie delle PCs, svolgono anche la funzione biologica di molecole di adesione alle nicchie stromali, migrazione e "homing" cellulare, mediando interazioni cellulari durante la risposta immunitaria e i processi di locomozione e invasione delle cellule maligne (5). Le pompe di estrusione dei farmaci, ancora non investigate a livello midollare, sono invece glicoproteine-P che regolano l'uscita dalla cellula di una vasta gamma di substrati lipofili differenti. Sono presenti in diversi organi e tessuti sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Tra esse, ci

Corrispondenza a: Francesco Gervasi, ARNAS Civico, Di Cristina e Benfratelli, Piazza Nicola Leotta 4, 90127 Palermo, E-mail francesco.gervasi@arnascivico.it

Ricevuto: 16.12.2016

Revisionato: 17.05.2017

Accettato: 19.05.2017

Pubblicato on-line: 02.08.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.038

sono il "cluster" di differenziamento 243 (CD243), i recettori per chemochine C-C (CCR1, CCR2, CCR6 e CCR7), i recettori chemochinici C-X-C (CXCR3 e CXCR4) e il recettore dell'IL6 (IL6R).

La "multi-drug resistance" (MDR1) o CD243 è una glicoproteina-P integrale di membrana di ~170 kDa, costituita da 1280 amminoacidi, appartenente alla superfamiglia dei trasportatori ABC ("ATP-binding cassette"). E' una potente pompa di efflusso cellulare ATP-dipendente in grado di regolare l'uscita dalla cellula di una vasta gamma di substrati lipofili differenti, tra cui molti farmaci antitumorali, come le antracicline, farmaci anti-HIV e mitoxantrone, ormoni steroidei e antibiotici. E' anche un fattore protettivo perché elimina le tossine e protegge i tessuti dai danni (6-9).

CCR1 o CD191 fa parte della superfamiglia dei recettori per chemochine C-C. I ligandi di questo recettore includono MIP1a (proteina 1a infiammatoria dei macrofagi) e RANTES ("regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted"), proteina espressa fisiologicamente dai linfociti T, detta anche CCL5. Le chemochine e i loro recettori che mediano un segnale di trasduzione sono importanti per il reclutamento di cellule immunoeffettrici nei siti di infiammazione (10). CCR2 o CD192 è un altro recettore chemochinico C-C. Il gene codifica per due isoforme specifiche, entrambe affini per il ligando CCL2 (proteina chemioattrattante per monociti), una proteina che media la chemiotassi dei monociti nell'infiltrato infiammatorio, nello specifico nella risposta infiammatoria contro i tumori (11). CCR6 o CD196, recettore per le chemochine C-C, deriva dalla superfamiglia dei recettori a proteine G. Questo gene è espresso dalle cellule dendritiche immature e dai linfociti T di memoria. Il ligando di questo recettore è MIP 3-a (12). CCR7 o CD197, recettore delle chemochine C-C, è espresso dalle cellule dendritiche nei tessuti periferici e per questo recettore sono stati identificati due ligandi (CCL19 e CCL21) posti sui linfonodi (13). CD183 è una chemochina recettore chiamata anche CXCR3, altamente espressa sulle cellule T effettrici, che gioca un ruolo importante sul traffico e sull'espressione di queste stesse cellule. E' attivato da 3 ligandi, CXCL9 o "monokine induced by γ interferon" (MIG), CXCL10 o "interferon γ -induced protein 10" (IP-10) e CXCL11 o "interferon-inducible T-cell α chemoattractant" (I-TAC). Media la migrazione dei linfociti T "helper" (Th1) e T-CD8 nei siti periferici, dove è presente un microambiente infiammatorio, e facilita la presentazione dell'antigene alle cellule T (14). CD184, conosciuto anche come CXCR4, è un recettore per le chemochine specifico per il fattore di derivazione stromale 1 (SDF-1, anche chiamato CXCL12), una molecola conosciuta per la potente attività chemiotattica per i linfociti. Questo recettore può essere usato dal virus HIV per infettare le cellule TCD4+. SDF-1 è importante nell'"homing" della staminale ematopoietica e studi recenti hanno mostrato come questa chemochina leghi solo questo recettore, mentre altre sono promiscue (15, 16). CD126 è il recettore dell'IL6. IL6 è una citochina pleiotropica che orchestra non solo una pletera di funzioni fisiologiche vitali, ma anche molti tipi di tumori solidi e

liquidi. E' stata recentemente dimostrata una sovraespressione del recettore per IL6 sulle PCs maligne in più del 80% dei pazienti affetti da MM e MGUS; infatti, CD126 è un fattore cruciale per la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule del MM; è anche un potente stimolatore di osteoclastogenesi e scultore del microambiente tumorale nel midollo osseo di pazienti affetti da MM (17).

Scopo di questo studio è stato quello di determinare un'ulteriore caratterizzazione immunofenotipica del compartimento plasmacellulare in pazienti affetti da MM e MGUS. A tal fine, importante è il ruolo della MFC nel ricercare vecchi e nuovi attori midollari del microambiente tumorale, tra cui recettori cito-chemochinici e pompe di estrusione dei farmaci, e nel determinare la differente espressione di questi antigeni tra PCs normali e neoplastiche in pazienti affetti da MM, e la differente espressione delle stesse molecole in pazienti con MM e con MGUS. La scelta delle molecole recettoriali prese in esame deriva dalla certezza della loro espressione a livello del microambiente midollare, resa nota da un lavoro di Moller et al. del 2003 (18).

MATERIALI E METODI

Soggetti

Per il seguente lavoro è stata rispettata e applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 ed è stato richiesto il consenso informato a ogni paziente. Sono stati raccolti 55 campioni di sangue midollare divisi in: 10 controlli [affetti da piastrinopenia e linfoma non Hodgkin (LNH) senza coinvolgimento midollare, di cui 6 di sesso maschile, con un'età media di 57 anni], 35 pazienti con MM sintomatico divisi in 10 all'esordio e 25 in monitoraggio, di cui 5 con malattia in progressione, 10 in remissione (3 molto buona, 6 parziale, 1 stabile) e 10 in remissione completa (Tabella 1) e 10 pazienti con MGUS (7 maschi), di cui 8 valutati all'esordio e 2 in rivalutazione.

Per ciascun campione l'analisi è avvenuta contestualmente al prelievo su 3 mL di sangue midollare. Lo stadio del MM è stato definito secondo i criteri di Durie-Salamon e ISS (19, 20) e la risposta alla terapia secondo i criteri di Bird et al. (21).

Recettori cito-chemochinici e pompe d'estrusione

Sui campioni prelevati è stata prima effettuata una conta cellulare mediante Draq5 1,5Bis2-(dimethylamino) ethylamino-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione, un agente con alta permeabilità cellulare che interagisce con il DNA marcando così tutte le cellule nucleate del campione al fine di conoscerne il numero ed effettuare eventuali diluizioni. I gruppi di campioni che sono stati sottoposti a diluizione sono quelli che hanno presentato una cellularità $>20 \times 10^9$ cell/L al fine di ottenere una cellularità di 10^9 cell/L ottimale per lo svolgimento delle analisi di MFC.

I campioni sono stati prima analizzati mediante MFC

Tabella 1
Caratteristiche dei pazienti in studio affetti da mieloma multiplo

N°	Media CD38+	All'esordio	In monitoraggio		
35	6,7%	10	25		
M 20	7,7%	7	13		
F 15	5,3%	3	12		
Linee di trattamento		Progressione (n=5)	Remissione (n=10)	Remissione completa (n=10)	
Lenalidomide		20%	-	40%	
Talidomide		-	-	20%	
Bortezomib desametasone		50%	20%	-	
Bortezomib Ciclofosamide Desametasone		-	20%	-	
Bortezomib Talidomide Desametasone		-	30%	-	

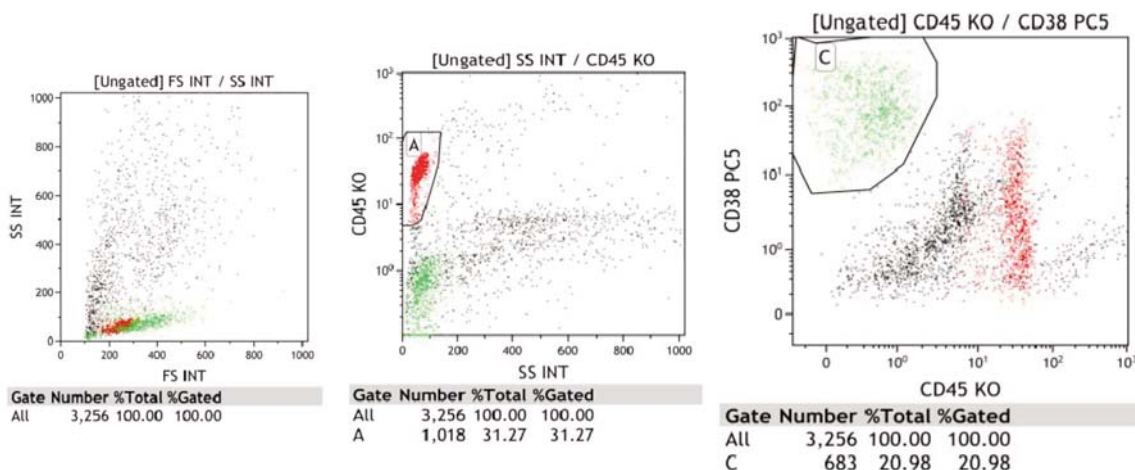


Figura 1
 Verifica al citofluorimetro della corretta separazione e selezione delle cellule mononucleate (linfociti e monociti). I campioni sono stati stratificati mediante terreno Lymphoprep e sono state prelevate solo le cellule mononucleate depositate ad anello tra il Lymphoprep e il plasma. Il primo "plot" descrive la distribuzione delle cellule midollari aspirate secondo i parametri fisici SSC (granulosità intracellulare) e FSC (dimensioni). Nel "plot" centrale, attraverso l'espressione biparametrica CD45-SSC, è stata messa in evidenza la popolazione leucocitaria rimasta e nello specifico, all'interno del gate A, i linfociti. Nel terzo "plot" mediante la strategia di "gating" (gate C) sono state isolate le plasmacellule di interesse, caratterizzate dall'espressione dell'antigene CD38+. Le restanti cellule CD45+ corrispondono ai granulociti rimasti al momento della separazione cellulare (in grigio) e ai linfociti CD38- (in rosso).

utilizzando anticorpi monoclonali (MoAb) specifici per una caratterizzazione immunofenotipica delle popolazioni cellulari presenti e per valutare il carattere neoplastico delle PCs. Successivamente, i campioni sono stati stratificati mediante Lymphoprep per separare le cellule midollari sfruttando la diversa densità delle cellule mononucleate (MNC) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue. Ne è stata valutata al citofluorimetro la corretta selezione (Figura 1). I campioni contenenti solo MNC (linfociti, monociti) sono

stati sottoposti a un sistema immunomagnetico di separazione su colonna [metodo MACS–Sorting ("Magnetic Activated Cell Sorter"), Miltenyi Biotec], che permette di separare le cellule CD138+ (PCs) dalle restanti cellule presenti nel campione stratificato (22). Infine, sui campioni ottenuti contenenti solo PCs, siamo andati a ricercare, mediante MFC, l'espressione dei recettori citochemochinici CD243, CD191, CD192, CD196, CD197, CD183, CD184 e CD126.

Ciclo cellulare

Le PCs presenti nei campioni di sangue midollare, sono state studiate anche mediante il kit Cycloscope (Citognos) nelle varie fasi del loro ciclo cellulare (G0/G1, S e G2/M) per ricercare l'eventuale presenza di aneuploidie nel genoma attraverso il calcolo del DNA index (D.I.) (contenuto di DNA nelle cellule neoplastiche/contenuto di DNA nelle cellule normali del campione). Un soggetto affetto da MM o MGUS può presentare delle alterazioni nel genoma (aneuploidie) identificate attraverso parametri standard. In base al D.I., un soggetto può essere ipodiploide, con valori di D.I. <0,95, pseudodiploide, con valori compresi tra 0,95 e 1,05, iperdiploide (>47 cromosomi), con D.I. compreso tra 1,05 e 1,74, o tetradiploide, con valori D.I. $\geq 1,75$. La metodica identifica più del 95% di PCs mielomatose (23, 24).

Quando la singola cellula passa attraverso il sistema fluidico e ottico del citometro viene colpita dal fascio di luce laser e per ciascuna cellula lo strumento descrive una curva gaussiana misurando area e altezza del picco. Le singole PCs hanno area e altezza del picco che crescono in maniera direttamente proporzionale; il razionale su cui si fonda la metodica prevede l'esclusione dei doppietti di PCs che hanno invece area doppia ma stessa altezza del picco; questo potrebbe inficiare l'analisi di calcolo del D.I. perché non si tratterebbe di aneuploidia ma solamente di doppietti che impiegano più tempo ad attraversare il laser.

Analisi statistica

La valutazione dei dati è stata eseguita con programma Medcalc. Il metodo statistico utilizzato per l'analisi è il test Mann-Whitney non parametrico, con un valore di probabilità $\leq 0,05$. Nel confronto tra campioni indipendenti, per ciascun recettore citochemochinico e pompa d'estrusione sono stati calcolati mediana, intervallo di confidenza e intervallo interquartile.

RISULTATI

Sui campioni patologici si è utilizzato il pannello diagnostico che include 35 MoAb specifici per una caratterizzazione immunofenotipica delle PCs e delle altre cellule del campione, al fine di avere un quadro generale della distribuzione delle popolazioni cellulari presenti ed effettuare una diagnosi differenziale tra MGUS e MM. Come evidenziato dai dati riportati nella Tabella 2, CD38 e 138 che identificano le PCs, e nello specifico l'espressione del CD56, che caratterizza le neoplastiche, erano espressi nella totalità o quasi dei nostri campioni, mentre non tutti gli antigeni di superficie mostravano un'espressione stabile nei vari campioni presi in esame. Su 35 pazienti affetti da MM, solo CD117, CD200, CD20, CD33, CD27 e CD28 erano espressi in più del 50% dei casi.

Tutti i campioni sono stati sortati mediante MACS-Sorting ottenendo per ciascuno il 60-70% di PCs. E'

Tabella 2

Espressione dei marcatori immunofenotipici ricercati nei campioni oggetto di studio

Anticorpo monoclonale ^a	Mieloma multiplo (n=35)	Gammopatia monoclonale di significato indeterminato (n=10)
CD38	100%	100%
CD138	100%	100%
CD45	37%	50%
CD19	49%	70%
CD56	89%	90%
CD20	63%	70%
CD200	83%	60%
CD117	71%	40%
CD30	26%	20%
CD33	60%	50%
CD81	34%	90%
CD34	40%	40%
CD10	60%	40%
CD27	89%	50%
CD28	80%	60%
<i>Immunoglobulina coinvolta</i>		
IgA	12% ^b	10%
IgG	57% ^b	30%
IgD	8,5% ^b	60%
Catene leggere λ	17% ^b	20%
Catene leggere κ	51% ^b	30%

^aInterpretazione: negativo <10%, positivo >20%.

^bI dati riportati sono rappresentativi del gruppo in esordio di malattia.

seguita una valutazione della corretta selezione delle cellule d'interesse attraverso MFC, come mostrato nella Figura 2.

L'analisi MCF eseguita su aspirato midollare opportunamente sortato per selezionare solo la popolazione plasmacellulare di interesse consente di trovare recettori e pompe d'estrusione presenti sulla membrana delle PCs, che creano un "cross-talk" tra il microambiente midollare e le plasmacellule mielomatose. Per ciascuna molecola sono stati valutati il valore percentuale e la "mean fluorescence intensity" (MFI), mettendo a confronto la loro espressione nei controlli e nei campioni di MM e MGUS (Figura 3). Abbiamo ottenuto per ciascun recettore una rilevante espressione sulla superficie cellulare sia nelle PCs di MM che di MGUS, con valori compresi tra 30% e 80%.

Dal confronto della MFI delle PCs tra campioni di MM

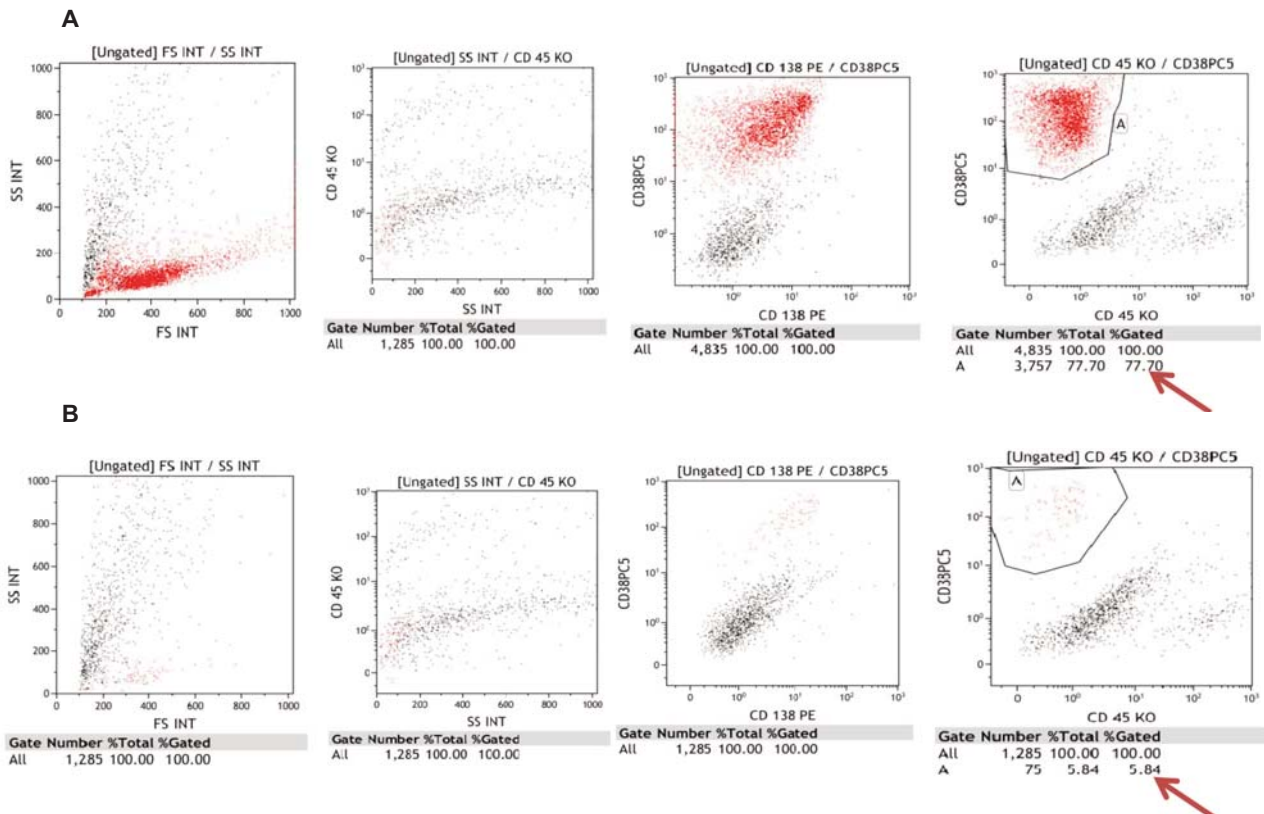


Figura 2

Verifica al citofluorimetro della corretta selezione plasmacellulare in seguito a metodo MACS-Sorting.

A) Il primo e il secondo "plot" descrivono la distribuzione delle cellule sortate secondo i parametri fisici SSC/FSC e CD45-SSC. Nel terzo e quarto "plot" attraverso il gate A viene evidenziato che mediante la tecnica del sorting è stato possibile isolare il 77,7% delle plasmacellule CD38+ CD45- rispetto alla restante popolazione midollare. B) Controllo negativo: è stata svolta la stessa analisi, ma utilizzando come campione l'eluato (gate A, 5,8% di plasmacellule).

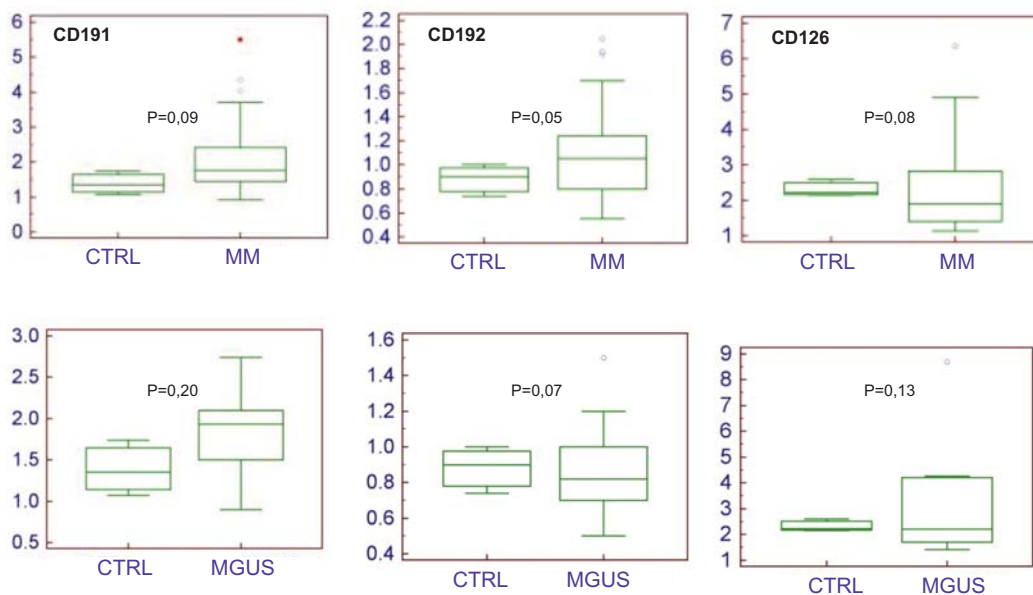
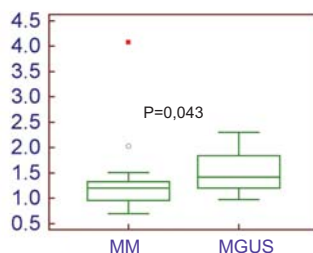
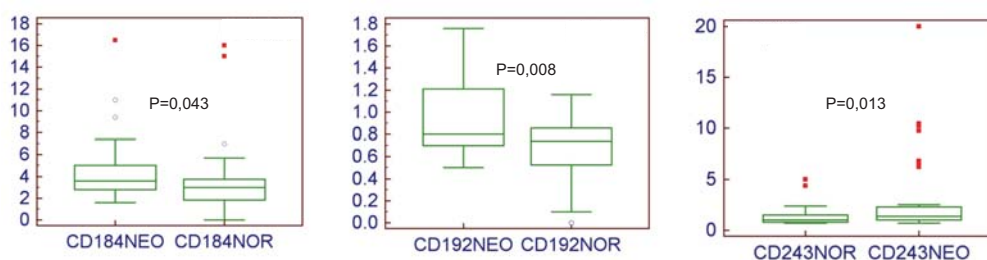


Figura 3

Confronto tra "mean fluorescence intensity" di recettori e pompa d'estruzione nei controlli (CTRL), nei pazienti con mieloma multiplo (MM) e nei soggetti con gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS).

**Figura 4**

Confronto tra "mean fluorescence intensity" del CD197 tra pazienti con mieloma multiplo (MM) e soggetti con gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS).

**Figura 5**

Confronto tra "mean fluorescence intensity" di CD184, CD192 e CD243 nelle plasmacellule neoplastiche (NEO) e normali (NOR) dei pazienti con mieloma multiplo.

e MGUS è emerso che CD243, CD192, CD183, CD191 e CD196 mostravano una maggiore espressione nei casi di MM rispetto ai campioni MGUS. In questi ultimi emergeva una maggiore espressione di CD197, CD184 e CD126 (Figura 4). Dal confronto del MFI tra PCs neoplastiche e normali nei campioni di MM è emerso invece che tutti i recettori risultavano essere maggiormente espressi sulla superficie delle PCs neoplastiche (Figura 5).

Su 15 campioni di sangue midollare da soggetti affetti da MM e MGUS presi in esame, 14 casi hanno riportato presenza di pseudodiploidia. Un solo caso invece è risultato iperdiploide. In tutti i campioni è stata evidenziata una normale distribuzione del ciclo cellulare (MFI della fase G_2/M maggiore rispetto alla fase G_0/G_1).

DISCUSSIONE

La complessa interazione tra le PCs del MM e il microambiente midollare, e soprattutto il coinvolgimento di tale interazione nella fisiopatologia del MM, sono il nucleo di un campo di ricerca in espansione molto stimolante. MFC permette la determinazione dei profili immunofenotipici delle PCs neoplastiche e lo studio simultaneo delle caratteristiche delle altre popolazioni cellulari nello stesso campione. Il primo passo è quello di caratterizzare immunofenotipicamente ogni campione per conoscerne la percentuale di PCs presenti e la loro natura neoplastica attraverso l'utilizzo di un pannello che racchiude i principali MoAb necessari per caratterizzare MM o MGUS. Tutti gli antigeni rimangono di

fondamentale importanza in quanto aiutano nella caratterizzazione cellulare e forniscono informazioni accurate su prognosi e monitoraggio. La fase successiva prevede la stratificazione del sangue midollare mediante terreno Lymphoprep; la corretta selezione delle MNC (linfociti e monociti) di interesse è valutata mediante MFC, utilizzando il metodo MACS-Sorting per separare le cellule CD138+ (PCs) dalle restanti cellule presenti nel campione di midollo osseo. L'analisi è svolta valutando l'espressione in termini di percentuale e MFI di ciascun recettore e pompa d'estruzione con il CD38, sia sul "gate" di PCs totali, attraverso il "plot" CD38/CD45, sia sul "plot" che mette in risalto e al contempo separa le PCs normali (CD56-/19+) da quelle neoplastiche (CD56+/19-).

Dalla nostra analisi è stato possibile evidenziare valori di percentuale e MFI più elevati sulle PCs di MM rispetto ai casi di MGUS e una maggiore espressione sulle PCs neoplastiche rispetto alle normali. Altri gruppi avevano già messo in evidenza la presenza nel midollo di alcuni di questi recettori e l'importante ruolo paracrina e autocrino che svolgono nello sviluppo e proliferazione dei cloni neoplastici per il loro "cross talk" con le cellule del microambiente midollare (18). In questo studio, abbiamo individuato che la pompa d'estruzione (CD243) ha un'elevata espressione sulle PCs neoplastiche rispetto alle normali nei pazienti con MM; ciò è indice del fatto che questo marcatore, determinando resistenza multifarmaco nelle chemioterapie anti-cancro, favorisce la crescita e la sopravvivenza delle PCs nelle nicchie

midollari. Sulla base dei nostri risultati supponiamo che in futuro questi marcatori possano essere utilizzati per una diagnosi e prognosi più accurate, potendo anche potenzialmente diventare nuovi "target" terapeutici.

Abbiamo valutato il ciclo cellulare delle PCs normali e neoplastiche dei nostri campioni e le eventuali aneuploidie del genoma di queste cellule al fine di una diagnosi differenziale tra MM e MGUS, di una valutazione prognostica dei pazienti e per la determinazione della mmR. Dai risultati ottenuti su una sottopopolazione dei nostri campioni, abbiamo evidenziato che nei casi di MM e MGUS, a dispetto del numero modale di 46 cromosomi, vi sono aberrazioni rappresentate da riarrangiamenti spesso anche multipli che rendono i nostri pazienti di prognosi peggiore, considerandone anche l'età avanzata. E' importante proseguire con l'analisi di queste alterazioni per ottenerne una caratterizzazione migliore in termini sia di meccanismi molecolari coinvolti che di valore prognostico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Moreau P, San Miguel J, Ludwig H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Oncol* 2013;24:133-7.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-48.
- Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17:e328-46.
- Pojero F, Casuccio A, Parrino MF, et al. Old and new immunophenotypic markers in multiple myeloma for discrimination of responding and relapsing patients: the importance of "normal" residual plasma cell analysis. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88:165-82.
- B Klein, XG Zhang, ZY Lu et al. Interleukin-6 in human multiple myeloma *Blood* 1995;85:863-72.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:13-33.
- Zaman GJ, Versantvoort CH, Smit JJ, et al. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1993;53:1747-50.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R1495-503.
- Chang XB. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:15-37.
- Gilliland CT, Salanga CL, Kawamura T, et al. The chemokine receptor CCR1 is constitutively active, which leads to G protein-independent, β -arrestin-mediated internalization. *J Biol Chem* 2013;288:32194-210.
- Wong LM, Myers SJ, Tsou CL. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem* 1997;272:1038-45.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 2007;204:2803-12.
- Nakata B, Fukunaga S, Noda E, et al. Chemokine receptor CCR7 expression correlates with lymph node metastasis in pancreatic cancer. *Oncology* 2008;74:69-75.
- Cerny C, Bronger H, Davoodi M, et al. The role of CXCR3/ligand axis in cancer. *International Trends in Immunity* 2015;3:46-52.
- Hartmann TN, Burger M, Burger JA, et al. The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004;18:126-30.
- Paiva B, Pérez-Andrés M, Vidriales MB, et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution. *Leukemia* 2011;25:697-706.
- Szcepek AJ, Belch AR, Pilarski LM. Expression of IL6 and IL6 receptor by circulating clonotypic B cells in multiple myeloma potential for autocrine and paracrine networks. *Exp Hematol* 2001;29:1076-81.
- Möller C, Strömberg T, Juremalm M, et al. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia* 2003;17:203-10.
- Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;842-54.
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 3412-20.
- Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al; Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J Haematol* 2011;154:32-75.
- Kammerer U, Marzusch K, Kröber S, et al. A subset of CD56+ large granular lymphocytes in first-trimester human decidua are proliferating cells. *Fertil Steril* 1999;71:74-9.
- Orfao A, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges MC, et al. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry* 1994;17:332-9.
- Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, et al. Prognostic implications of DNA aneuploidy in 156 untreated myeloma patients. *Br J Haematol* 1999;90:106-12.

Durata della fibrinolisi post-operatoria e rischio trombotico dopo somministrazione di acido tranexamico negli interventi di protesi d'anca e ginocchio

Laura Erroi¹, Barbara Montaruli¹, Vito Camarda², Piera Sivera³, M. Bruzzone², R. Rossi², Marco Migliardi¹

¹Laboratorio Analisi, ²Ortopedia e Traumatologia e ³Ematologia e Terapie Cellulari, Ospedale Mauriziano Umberto I, Torino

Questo lavoro è stato in parte presentato al 48° Congresso Nazionale SIBioC, 18-20 Ottobre 2016, Torino, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (L. Erroi), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Duration of post-operative fibrinolysis and thrombotic risk after tranexamic acid administration in hip and knee prosthesis interventions. Strong evidence indicates that TXA reduces blood loss and blood transfusion requirement in orthopedic surgery. However, drug safety and side effects are still a controversial issue, because TXA may increase thromboembolic risk. Aim of our study was to quantify the duration of postoperative fibrinolysis and to assess the impact of TXA administration after total hip (THR) and total knee replacement (TKR). Fifteen patients undergoing THR and 10 undergoing TKR were included in the study. Among these patients, 14 THR and 8 TKR received TXA, while 3 (one THR and 2 TKR) were employed as controls (i.e., no TXA administration). D-dimer and thrombin generation time were measured prior to surgery as well as 3, 6, 24 and 72 h after. No statistically significant difference in D-dimer was observed between patients treated and not treated with TXA, even if D-dimer increased postoperatively (6 h) more in patients not treated with TXA than in patients receiving TXA. Thrombin peak was lower in patients treated with TXA than in patients not receiving it. Our study shown that TXA limits postoperative fibrinolysis after THR and TKR, as evidenced by a lesser increase in D-dimer in patients receiving TXA, with no increase in prothrombotic risk.

INTRODUZIONE

La chirurgia ortopedica maggiore è spesso complicata da emorragie con importante anemizzazione e necessità trasfusionale. La trasfusione di globuli rossi non è però priva di effetti collaterali, come la possibilità di trasmissione di malattie virali e/o l'insorgenza di immunosensibilizzazione. La tendenza al sanguinamento sembra secondaria a una fase di iperfibrinolisi che si osserva durante l'intervento chirurgico e che si può protrarre per un breve periodo dopo il termine dell'intervento (1-4). L'iperfibrinolisi è indotta dall'ipossia, dall'ipotensione arteriosa, dalla presenza di citochine circolanti che stimolano le cellule endoteliali a liberare l'attivatore del plasminogeno tissutale, che una volta in circolo catalizza la trasformazione del plasminogeno in plasmina e quindi la lisi della fibrina insolubile in prodotti di degradazione della fibrina. La durata della iperfibrinolisi post-operatoria è di ~48 ore e la sua persistenza può aumentare il rischio di sanguinamento (2-4).

Studi clinici hanno dimostrato che l'uso intraoperatorio degli antifibrinolitici nella chirurgia ortopedica in elezione di anca e ginocchio è in grado di ridurre il sanguinamento e quindi di ridurre le richieste trasfusionali; questo comporta la riduzione degli effetti collaterali della terapia trasfusionale, oltre a una consistente riduzione dei costi (5, 6). Il dato è confermato da recenti studi di metanalisi (7, 8). In particolare, studi hanno dimostrato come la somministrazione di un amminoacido antifibrinolitico sintetico, l'acido tranexamico (TXA), determini una riduzione delle perdite ematiche conseguenti alla chirurgia protesica d'anca e di ginocchio (9-14). Il TXA è un analogo sintetico della lisina che agisce come agente antifibrinolitico, in quanto si lega reversibilmente al plasminogeno e quindi blocca il legame del plasminogeno stesso con la fibrina e la sua attivazione a plasmina. La sua distribuzione nello spazio extravascolare e il suo accumulo nei tessuti è alla base dell'efficacia in condizioni emorragiche causate da iperfibrinolisi locale. Gli studi sinora prodotti indicano che

Corrispondenza a: Laura Erroi, Laboratorio Analisi, AO Ordine Mauriziano, Largo Turati 62, 10128 Torino. Tel. 0115085050, Fax 0115082668, E-mail erroi.laura@gmail.com

Ricevuto: 31.01.2017

Revisionato: 02.05.2017

Accettato: 10.05.2017

Pubblicato on-line: 31.07.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.032

l'uso peri-operatorio degli antifibrinolitici, in particolare del TXA, non aumenta l'incidenza di eventi tromboembolici (6, 15, 16). In ogni caso, nonostante il suo ampio utilizzo, le linee guida correnti non raccomandano ancora l'utilizzo del TXA in chirurgia ortopedica d'anca e di ginocchio in quanto non sono noti il dosaggio ottimale e la durata del trattamento (17).

Sinora, relativamente pochi studi hanno valutato e monitorato i marcatori di attività fibrinolitica in corso di chirurgia ortopedica e i risultati prodotti appaiono contraddittori (3, 8, 16). In considerazione del crescente utilizzo degli antifibrinolitici, diventa importante studiare la dinamica della fibrinolisi post-operatoria nell'ottica di ottimizzare la durata di somministrazione dei farmaci antifibrinolitici, con conseguenti vantaggi sia clinici che economici. Gli obiettivi primari del nostro studio sono stati quelli di:

- a) valutare i parametri di fibrinolisi in corso di chirurgia maggiore ortopedica in elezione di anca (PTA) e di ginocchio (PTG), prima e dopo l'inizio della terapia antifibrinolitica;
- b) valutare i parametri di fibrinolisi nello stesso tipo di pazienti che per varie motivazioni (ipersensibilità nota verso il farmaco, storia di trombosi venose e/o arteriose, cardiopatia grave, pregresso ictus ischemico, compromissione renale e/o epatica grave, storia di convulsioni) non potevano ricevere la profilassi con antifibrinolitici.

Obiettivo secondario dello studio è stata la valutazione della perdita ematica tramite il dosaggio delle concentrazioni ematiche di emoglobina (Hb) prima dell'intervento e 6, 24, 72 ore dopo in tutti i pazienti studiati.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Lo studio prevedeva l'arruolamento di pazienti che si sottopongono a PTA/PTG. I criteri di inclusione ed esclusione per l'arruolamento sono stati i seguenti:

- a) inclusione:
 - età >18 anni,
 - firma del consenso informato;
- b) esclusione:
 - età <18 anni,
 - allattamento,
 - mancata firma del consenso informato,
 - assunzione di aspirina o farmaci antiaggreganti nei 7 giorni precedenti l'intervento,
 - ipersensibilità nota al TXA,
 - storia di eventi da tromboembolismo venoso e/o arterioso e/o precedente ictus ischemico, e/o malattia cardiaca severa (infarto del miocardio da meno di 6 mesi, angina instabile, moderata o severa stenosi aortica o mitrale), e/o insufficienza renale ["estimated glomerular filtration rate", (eGFR) <30 mL/min], e/o cirrosi epatica e/o storia di eventi convulsivi.

Lo studio è stato condotto, dopo approvazione del

comitato etico, nel periodo compreso fra dicembre 2015 e marzo 2016.

Posologia TXA

Il protocollo prevedeva due somministrazioni di TXA: una 10 min prima del rilascio del laccio pneumatico (tempo identificato con il termine della cementazione protesica) alla dose di 10 mg/kg, diluito in 50 mL di soluzione fisiologica, in infusione lenta (ovvero in ~10 min), e una successiva dose di 10 mg/Kg in 50 mL di soluzione fisiologica 3 ore dopo il rilascio del laccio pneumatico (infusione lenta in 10 min).

Campioni ed esami di laboratorio

In tutti i pazienti sono stati eseguiti 5 prelievi di sangue venoso in provette Vacutainer da 3 mL contenenti una soluzione di citrato disodico 0,109 M nella proporzione sangue/anticoagulante 9:1. I tempi dei prelievi erano:

- prima dell'intervento chirurgico (basale),
- 3 ore dopo induzione con TXA (H3),
- 6 ore dopo induzione con TXA (H6),
- 24 ore dopo induzione con TXA (H24),
- dopo 72 ore dall'inizio dell'intervento chirurgico (H72).

Il plasma è stato preparato mediante centrifugazione a 1300g per 15 min a temperatura ambiente e successivamente aliquotato e congelato a -70 °C. Lo scongelamento dei campioni è stato effettuato in termostato a 37 °C per alcuni minuti e le microprovette sono state invertite dolcemente prima dell'analisi.

Su tutti i campioni sono stati effettuati i dosaggi di D-dimero (DD), con metodica immunoturbidimetrica al lattice (DDimero HS500, Instrumentation Laboratory, limite di riferimento <500 µg/L unità di fibrinogeno equivalenti, FEU), allo scopo di valutare il picco fibrinolitico, e la misura del tempo di generazione della trombina (TGT) in presenza di fattore tissutale 5 nM e/o trombomodulina ("Calibrated automated thrombogram", CAT, Diagnostica Stago), attraverso l'analisi del picco di trombina (nM di trombina) e il potenziale endogeno trombinico (ETP, nM di trombina/min), allo scopo di valutare la presenza di rischio protrombotico.

Di tutti i pazienti reclutati sono stati raccolti i seguenti dati: età, sesso, storia clinica, durata intervento, concentrazioni di Hb pre- e post-intervento, possibili complicanze arteriose e/o venose e complicazioni infettive. Hb è stata misurata prima dell'intervento chirurgico e 6, 24 e 72 ore dopo l'intervento.

Analisi statistica

Per tutti i calcoli statistici è stato utilizzato il "software" MedCalc 12.0.

La comparazione fra gruppi dopo PTG e PTA con e senza TXA è stata effettuata utilizzando il test di Mann-Whitney per le variabili continue o il test statistico di Fisher per le variabili categoriche. Un valore di P <0,05 identifica un'associazione statisticamente significativa fra le due variabili.

RISULTATI

Nello studio sono stati inclusi 25 pazienti, 17 donne e 8 maschi (età mediana, 62 anni; intervallo 38-89 anni). Di questi, 15 pazienti sono stati sottoposti a PTA e 10 a PTG. A 14 pazienti sottoposti a PTA e 8 pazienti sottoposti a PTG è stato somministrato TXA secondo protocollo. Solo 3 pazienti, invece, sono stati reclutati nel gruppo di controllo e sono stati operati senza terapia con TXA (un PTA e 2 PTG). I dati clinici dei pazienti reclutati sono riportati nella Tabella 1.

In accordo con quanto riportato in letteratura (3), abbiamo osservato un incremento dei valori di DD post-intervento (prelievo H6) nel gruppo dei pazienti operati senza TXA (media, 11.133 $\mu\text{g/L}$ FEU) rispetto al gruppo dei pazienti trattati con TXA (media, 5263 $\mu\text{g/L}$ FEU).

Abbiamo osservato mediante il TGT valori medi di picco più elevati nei pazienti sottoposti a PGT o PTA non trattati con antifibrinolitico rispetto al gruppo dei pazienti trattati. Entrambi i gruppi avevano cominciato la profilassi antitrombotica 12 ore dopo l'intervento chirurgico (Tabella 2). Allo stesso modo, per i livelli di ETP, i valori medi dei pazienti del gruppo di controllo sono quasi sempre risultati più elevati rispetto al gruppo dei pazienti trattati con TXA (Tabella 2).

Abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa nei valori di Hb misurati a 24 ore dall'intervento fra il gruppo trattato (+TXA) e il gruppo non trattato (-TXA) [mediana (intervallo) +TXA, 108 (72-145) g/L vs. mediana (intervallo) -TXA, 92 (77-113) g/L, $P=0,0005$].

DISCUSSIONE

Gli interventi di PTA/PTG sono fra i più comuni nell'ambito della chirurgia ortopedica. Le perdite ematiche sono un problema piuttosto rilevante di questa procedura e in letteratura sono riportate percentuali di emotrasfusione significative (18). Sono numerosi gli studi degli ultimi anni che dimostrano come la somministrazione di TXA determini una riduzione delle perdite ematiche in questi pazienti (5-10, 12, 13). Tutti i lavori hanno osservato, inoltre, l'assenza di un incremento del rischio trombotico o di altri eventi avversi

nei pazienti trattati con antifibrinolitico. Nonostante i dati incoraggianti, però, questa procedura non è ancora stata inserita nelle linee guida di ortopedia in quanto non sono noti il dosaggio ottimale e la durata del trattamento, ed è ridotto il numero di studi che hanno valutato i marcatori di attività fibrinolitica in questi pazienti.

Il nostro studio dimostra che il picco della fibrinolisi viene raggiunto, come evidenziato dall'aumento del DD osservato in tutti i pazienti sottoposti a PTA e/o PTG con e senza TXA, 6 ore dopo l'intervento chirurgico, con un successivo decremento a 72 ore post-intervento. È interessante osservare però che la somministrazione di TXA (10 mg/kg nell'intraoperatorio e 10 mg/kg 3 ore dopo l'intervento chirurgico) limita la fibrinolisi post-intervento, come dimostrato dal minore incremento dei valori di DD nei pazienti che hanno ricevuto l'antifibrinolitico rispetto al gruppo di controllo.

Nel nostro studio, così come riportato in letteratura (3), abbiamo osservato una riduzione statisticamente significativa dell'Hb nel prelievo effettuato 24 ore dopo l'intervento nei controlli rispetto ai pazienti trattati con

Tabella 1

Caratteristiche cliniche dei pazienti trattati (+TXA) e non trattati (-TXA) con acido tranexamico (TXA)

	+TXA	-TXA
Femmine/maschi	15/7	2/1
Età mediana (intervallo)	69 (38-83)	72 (50-89)
Iperensione arteriosa	11	2
Malattia cardiaca	3	-
Sindromi autoimmuni	2	1
Ipotiroidismo	1	1
Diabete mellito	1	-
Malattie respiratorie	4	1
Malattia gastrointestinale	6	1
Anemia severa (dopo chirurgia)	4	-
Allergie	5	-
Neoplasie precedenti	4	1
Displasia congenita dell'anca	5	-

Tabella 2

Picco della trombina (nM di trombina) e potenziale endogeno trombinico (ETP, nM di trombina/min) osservato prima della chirurgia (preoperatorio), a 3 (H3), 6 (H6), 24 (H24) e 72 (H72) ore dopo chirurgia con e senza trattamento con acido tranexamico (TXA). I risultati sono riportati come media e intervallo di confidenza al 95%

	Preoperatorio	H3	H6	H24	H72
Picco trombina +TXA	283 (260-306)	295 (265-325)	259 (242-276)	226 (196-256)	282 (258-306)
Picco trombina -TXA	376 (167-586)	303 (97-508)	290 (127-452)	272 (41-503)	396 (266-526)
ETP +TXA	1296 (1179-1413)	1321 (1191-1451)	1106 (1023-1189)	1024 (914-1133)	1174 (1050-1299)
ETP -TXA	1583 (564-2602)	1338 (321-2355)	1313 (849-1777)	1250 (482-2018)	1660 (1018-2301)

TXA, anche se 4 dei pazienti trattati con +TXA hanno avuto una severa anemia tale da richiedere una trasfusione.

Il rischio tromboembolico è una delle maggiori complicanze che si possono verificare immediatamente dopo chirurgia ortopedica maggiore. L'utilizzo del TXA potrebbe aumentare questo rischio; una ridotta attività fibrinolitica potrebbe essere infatti associata a un aumentato rischio trombotico (6, 16). Alcuni studi in letteratura hanno misurato i marcatori biologici di fibrinolisi (DD, plasmina, attivatore tissutale del plasminogeno) nel pre- e nel post-operatorio in chirurgia ortopedica, riportando risultati contrastanti sull'effetto che il TXA sembra avere su questi marcatori. Il nostro studio dimostra come non vi sia differenza nell'ETP fra i pazienti sottoposti a PTG e PTA trattati e non trattati con TXA, evidenziando una riduzione statisticamente significativa nel picco di generazione della trombina nel gruppo dei pazienti trattati rispetto ai pazienti non trattati. Questi risultati di laboratorio sembrano quindi confermare i dati della letteratura a sostegno dell'assenza di un aumentato rischio tromboembolico nei pazienti sottoposti a intervento di PTG o PTA e infusione di TXA.

In conclusione, pur con i limiti di uno studio non randomizzato, condotto su un numero esiguo di pazienti e soprattutto di controlli che non consente di trarre conclusioni definitive, possiamo affermare che dai risultati ottenuti la somministrazione di TXA nei nostri pazienti ha limitato il processo fibrinolitico post-intervento senza aumento del rischio trombotico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009;108:1433-46.
2. Sorensen JV, Borris LC, Lassen MR, et al. Association between plasma levels of tissue plasminogen activator and post operative deep vein thrombosis-influence of prophylaxis with a low molecular weight heparin. *The Venous Thrombosis Group. Thromb Res* 1990;59:131-8.
3. Blanié A, Bellamy L, Rhayem Y, et al. Duration of postoperative fibrinolysis after total hip or knee replacement: a laboratory follow-up study. *Thromb Res* 2013;131; e6-11.
4. Eriksson BI, Hultman E, Martinelli S, et al. Regional fibrinolysis following total hip replacement. *Thromb Res* 1991;62:441-7.
5. Lin ZX, Woolf SK. Safety, efficacy, and cost-effectiveness of tranexamic acid in orthopedic surgery. *Orthopedics* 2016;39:119-30.
6. Nishihara S, Hamada M. Does tranexamic acid alter the risk of thromboembolism after total hip arthroplasty in the absence of routine chemical thromboprophylaxis? *Bone Joint J* 2015;97-B:458-62.
7. Huang F, Wu D, Ma G, et al. The use of tranexamic acid to reduce blood loss and transfusion in major orthopedic surgery: a meta-analysis. *J Surg Res* 2014;186:318-27.
8. Yang ZG, Chen WP, Wu LD. Effectiveness and safety of tranexamic acid in reducing blood loss in total knee arthroplasty: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94:1153-9.
9. Cid J, Lozano M. Tranexamic acid reduces allogeneic red cell transfusions in patients undergoing total knee arthroplasty: results of a meta-analysis of randomized controlled trials. *Transfusion* 2005;45:1302-7.
10. Lemay E, Guay J, Cote C, et al. Tranexamic acid reduces the need or allogenic red blood cell transfusions in patients undergoing total hip replacement. *Can J Anaesth* 2004;51:31-7.
11. Poeran J, Rasul R, Suzuki S, et al. Tranexamic acid use and postoperative outcomes in patients undergoing total hip or knee arthroplasty in the United States: retrospective analysis of effectiveness and safety. *Br Med J* 2014;349:g4829.
12. Raksakietisak M, Sathitkammanee B, Srisaen P, et al. Two doses of tranexamic acid reduce blood transfusion in complex spine surgery: a prospective randomized study. *Spine* 2015;40:E1257-63.
13. Wind TC, Barfield WR, Moskal JT. The effect of tranexamic acid on transfusion rate in primary total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 2014;29:387-9.
14. Tuttle JR, Ritterman SA, Cassidy DB, et al. Cost benefit analysis of topical tranexamic acid in primary total hip and knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2014;29:1512-5.
15. Whiting DR, Gillette BP, Duncan C, et al. Preliminary results suggest tranexamic acid is safe and effective in arthroplasty patients with severe comorbidities. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:66-72.
16. Duncan CM, Gillette BP, Jacob AK, et al. Venous thromboembolism and mortality associated with tranexamic acid use during total hip and knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2015;30:272-6.
17. VHA Pharmacy Benefits Management Services, Medical Advisory Panel, VISN Pharmacist Executives and the National Surgery Office. Clinical recommendations for using tranexamic acid for reducing blood loss and transfusion requirements in patients undergoing total knee or total hip arthroplasty December 2014. https://www.pbm.va.gov/PBM/clinicalguidance/clinicalrecommendations/Tranexamic_Acid_in_TKA_or_THA_Clinical_Recommendations.pdf
18. Lasocki S, Krauspe R, von Heymann C, et al. PREPARE: the prevalence of perioperative anaemia and need for patient blood management in elective orthopaedic surgery: a multicentre, observational study. *Eur J Anaesthesiol* 2015;32:160-7.

Il microRNA-135b nella caratterizzazione molecolare del carcinoma della mammella “triplo negativo”

Giovanna Pira¹, Luciano Murgia², Francesca Sanges², Paolo Uva³, Paolo Cossu-Rocca², Federica Loi⁴, Sandra Orrù⁵, Maria Rosaria Muroli², Ciriaco Carru¹, Andrea Angius⁶, Maria Rosaria De Miglio²

¹Dipartimento di Scienze Biomediche e ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Sassari

³Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori della Sardegna (CRS4), Parco Scientifico e Tecnologico Polaris, Piscina Manna, Pula (CA)

⁴Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale, Cagliari

⁵Dipartimento di Patologia, Ospedale Oncologico “A. Businco”, ASL Cagliari, Cagliari

⁶Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Cittadella Universitaria di Cagliari, Monserrato (CA)

Questo lavoro è stato in parte presentato al 48° Congresso Nazionale SIBioC, 18-20 Ottobre 2016, Torino, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (G. Pira), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

miRNA-135b in molecular characterization of triple-negative breast cancer (TNBC). TNBC accounts for 12-24% of all mammary cancers (BC). Its clinical and genetic heterogeneity and the lack of unambiguous molecular targets contribute to the scarcity of therapeutic options for this BC variant. Recently, the BC molecular biology has entered in the era of microRNAs (miRNA), a class of small highly conserved regulatory endogenous non-coding RNAs, which control complicated signaling pathways, governing cell cycle, proliferation, differentiation, apoptosis, etc., and whose deregulation contributes to the tumour development. Our goal was to improve the knowledge of TNBC biology analyzing the miRNA expression profile and to identify new potential prognostic and predictive biomarkers. We conducted a human miRNome analysis by TaqMan Low Density Array comparing different TNBC subtypes, defined by immunohistochemical basal markers, such as epidermal growth factor receptor and cytokeratin 5/6. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction confirmed differential expression of miRNA. We identified a single miRNA signature given by miR-135b expression levels, which allowed the distinction of TNBC with and without basal-like phenotype. Our study sheds light on the molecular complexity of TNBC and shows for the first time that miR-135b expression is strictly related to TNBC basal-like molecular subtype, acting as an oncogene in the tumor pathogenesis.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della mammella (BC) è il tumore maligno più frequente nel sesso femminile e, nelle donne, rappresenta la causa di morte più comune per cancro uniformemente diffusa a livello mondiale (1). Le analisi dei profili di espressione genica hanno permesso di stabilire chiaramente la natura eterogenea del BC e di classificarlo in un insieme di distinti “intrinsic subtypes”, (Luminale A, Luminale B, ERB-B2+, “Basal-like” e “Normal breast-like”), ciascuno dei quali presenta differenti caratteristiche nella variabilità biologica e

clinica e nella risposta al trattamento (2, 3). Il sottotipo “Basal-like” del BC (BLBC) è caratterizzato dall’iperespressione delle citocheratine ad alto PM e da un fenotipo “triplo negativo” (TNP) che non esprime recettori per estrogeni e progesterone (ER, PR), né la proteina “Human epidermal growth factor receptor 2” (HER2), ed è contraddistinto da una marcata aggressività clinica paragonato ai sottotipi Luminale A e B. Nonostante la provata evidenza di un’elevata percentuale di sovrapposizione fra il fenotipo “Basal-like” e quello TNP (75% dei casi), è stato accertato che il restante 25% dei BC “triplo negativo” (TNBC) si identifica

Corrispondenza a: Maria Rosaria De Miglio, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Sassari, Viale San Pietro 8, 07100 Sassari. Tel. 3204299778, Fax 079213559, E-mail demiglio@uniss.it

Ricevuto: 28.02.2017

Revisionato: 03.04.2017

Accettato: 27.04.2017

Publicato on-line: 01.08.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.035

con altri "intrinsic subtypes" del BC (4, 5). L'elevata complessità molecolare dei TNBC è stata dimostrata da Lehmann et al. tramite l'analisi del trascrittoma, che ha permesso la caratterizzazione di 6 distinte sottoclassi: "Basal-like" 1 e 2 (BL1 e BL2), Immunomodulatore (IM), Mesenchimale "claudin-low-enriched" (M), Mesenchimale "stem-like" (MSL) e Luminale positivo per il recettore degli androgeni (LAR). Ciascuna di esse evidenzia un comportamento biologico peculiare e una specifica farmaco-sensibilità (6). Queste caratteristiche biologiche, l'eterogeneità clinica della malattia e l'assenza di bersagli molecolari inequivocabili rendono il trattamento dei pazienti affetti da TNBC particolarmente complesso.

La biologia molecolare del BC è entrata recentemente nell'era dei microRNA (miRNA); queste piccole molecole endogene di RNA non codificante regolano l'espressione genica interagendo con RNA messaggeri (mRNA) bersaglio, con conseguente degradazione o repressione traslazionale (7). I miRNA sono coinvolti nella regolazione di molteplici vie di trasduzione del segnale, le quali controllano importanti funzioni cellulari come proliferazione, differenziamento, apoptosi (8), e come tali possono aver un ruolo nello sviluppo dei tumori e rappresentare potenziali bersagli terapeutici (9).

Lo scopo di questo studio è stato l'analisi dei profili di espressione di ~380 miRNA, con l'obiettivo di identificare biomarcatori molecolari prognostici e predittivi e potenziali bersagli terapeutici nei sottotipi di TNBC che mostrano il fenotipo "basal-like" e "non-basal-like", questa ultima categoria, meglio definita come "Quintuple negative breast cancer" (QNBC) (10).

MATERIALI E METODI

Campioni

Lo studio è stato approvato dal comitato bioetico dell'Azienda Sanitaria Locale di Sassari (N° 1140/L 05/21/2013). Per la sua esecuzione sono stati selezionati dall'archivio del Dipartimento di Istopatologia di Cagliari, 106 campioni TNBC e 9 di tessuto mammario sano (NBT) da soggetti sottoposti a mastoplastica riduttiva, fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Tutti i casi sono stati rivalutati indipendentemente da due patologi esperti, secondo l'attuale classificazione WHO (11). Da ciascun campione sono state prelevate varie sezioni di tessuto di 3 µm di spessore per la colorazione con ematosilina ed eosina per l'esecuzione dell'analisi immunocitochimica e per le analisi genetiche.

I dati di "follow-up" disponibili per 102 pazienti affetti da TNBC sono stati raccolti a partire dal momento della diagnosi (gennaio 2000 - ottobre 2014) sino al dicembre 2014. Il tempo medio di "follow-up" era di 65 mesi (con un massimo di 183 mesi: 63% ≥36 mesi, 54% ≥60 mesi).

Immunocitochimica

La classificazione dei TNBC in sottotipo "basal-like" e "non-basal-like" è stata definita mediante analisi

immunocitochimica, utilizzando come marcatori basali l'"Epidermal growth factor receptor" (EGFR) e la citocheratina 5/6 (CK5/6). Nello specifico, i TNBC positivi per EGFR e/o CK5/6 sono stati classificati come BLBC, mentre i tumori negativi per entrambi i marcatori sono stati definiti QNBC (12).

La reazione immunocitochimica per CK5/6 è stata eseguita impiegando l'anticorpo monoclonale murino CK5/6 (clone CK5/6.007, diluizione 1:100, Biocare Medical) su un sistema di colorazione automatico (Benchmark Ultra Ventana, Roche). La determinazione dell'EGFR è stata eseguita utilizzando il kit EGFR pharmDx (DakoCytomation). L'espressione dei marcatori basali, valutata in modo semi-quantitativo, è stata definita positiva per CK5/6 e per EGFR quando, rispettivamente, le cellule neoplastiche mostravano immunoreattività per un valore >5% e >1%; l'intensità dell'immunocolorazione è stata espressa come negativa, debole, moderata e forte. Infine, per ciascun tumore è stata determinata la localizzazione subcellulare della reazione immunocitochimica.

Analisi del miRNoma umano

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di TNBC e NBT utilizzando il kit miRNeasy FFPE (Qiagen). La concentrazione e la purezza del RNA sono state determinate mediante spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La qualità del RNA estratto è stata valutata dalla determinazione del "RNA integrity number" (RIN) mediante l'utilizzo del kit Agilent RNA 6000 Nano e del Bioanalyzer 2100.

L'analisi del miRNoma è stata eseguita utilizzando la TaqMan Array Human MicroRNA Card A set v3.0 (Thermo Fisher Scientific) su un sottogruppo della nostra coorte costituito da 4 BLBC, 5 QNBC e 2 NBT. Questa metodica prevede l'analisi contemporanea di 384 miRNA presenti nel "database" Sanger miRBase 18.0. Ciascun campione è stato retrotrascritto in cDNA partendo da 1000 ng di RNA totale, utilizzando il Megaplex RT Primers Human Pool A (Thermo Fisher Scientific), che contiene un insieme di 377 "primer stem-looped" e 4 controlli, e il TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific).

Gli esperimenti di "quantitative reverse transcription polymerase chain reaction" (qRT-PCR) su TaqMan miRNA array sono stati eseguiti sulla strumentazione 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizzando: 450 µL di TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2X; Thermo Fisher Scientific), 6 µL di cDNA, 444 µL di H₂O in un volume finale di 900 µL. Una prima analisi sui dati ottenuti dalla qRT-qPCR è stata effettuata mediante i "software" SDS 2.4 e RQ Manager (Thermo Fisher Scientific). Successivamente all'identificazione di una lista di miRNA con espressione significativamente deregolata (p <0,05) tra i diversi tessuti analizzati, è stata effettuata una analisi di qRT-PCR per ognuno di essi in un "dataset" indipendente costituito da 24 BLBC, 28 QNBC e 9 NBT.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il "software" R (13). Le differenze tra i parametri clinico-patologici dei sottotipi di TNBC sono state analizzate mediante il test t di Student per le variabili a distribuzione normale oppure mediante il "chi-square" o il "Fisher's exact test". Per l'analisi multivariata, la stima dell'"hazard ratio" (HR) nei sottotipi di TNBC è stata effettuata tramite il modello di regressione di Cox utilizzando età, dimensioni del tumore, tipo istologico, grado, stadio, indice di proliferazione cellulare (Ki67) e presenza di linfociti nel tumore. L'"end-point" primario dell'analisi è rappresentato dalla sopravvivenza globale (OS) espressa come numero di mesi dalla diagnosi alla data di morte o dell'ultimo "follow-up", in assenza di eventi.

I livelli di espressione dei miRNA sono stati calcolati utilizzando il metodo comparativo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (14). Il "clustering" gerarchico dei dati di espressione dei miRNA è stato basato sulla correlazione di Pearson. Le variazioni di espressione dei miRNA statisticamente significative sono state determinate utilizzando la libreria di R "Statistical analysis of microarray" (SAM) (15), con un valore di P corretto ("false discovery rate") <0,05.

RISULTATI

Analisi comparativa tra TNBC "basal-like" e "non-basal-like"

I campioni inclusi nello studio sono stati classificati come TNBC in base all'assenza di espressione di ER, PR e HER2; inoltre, la determinazione del Ki67 ha evidenziato una immunoreattività variabile dal 6% al 95% delle cellule neoplastiche.

L'immunoreattività di EGFR e CK5/6 è stata descritta rispettivamente come membranosa o membranoso-citoplasmatica e citoplasmatica. L'espressione di EGFR era apprezzabile in 50 su 106 (47,2%) TNBC e quella di CK5/6 in 45 su 106 (42,5%). La co-espressione di EGFR e CK5/6 è stata evidenziata nel 50,8% (32/63) dei campioni, mentre il 40,6% (43/106) dei TNBC sono risultati negativi per entrambi i marcatori basali e classificati come TNBC senza caratteristiche "basal-like".

Le caratteristiche clinico-patologiche dei BLBC e QNBC inclusi nello studio sono riportate nella Tabella 1. Non sono state identificate differenze statisticamente significative tra i due sottotipi di neoplasie, tranne che nella distribuzione dell'espressione di EGFR e CK5/6, come previsto dalla classificazione immunoistochimica dei TNBC utilizzata in questo studio.

La Tabella 2 illustra i risultati ottenuti dall'analisi multivariata. I pazienti affetti da BLBC mostrano un aumento del rischio di morte rispetto a quelli affetti da QNBC, sebbene con una significatività statistica "borderline" (HR: 3,26, 95% intervallo di confidenza (CI): 0,98-10,1, P=0,054). Le dimensioni del tumore rappresentano un buon fattore predittivo di sopravvivenza globale: infatti, era rilevato un aumento del rischio di morte per dimensioni >2 cm (HR: 3,25, 95% CI: 1,28-8,30, P=0,013). Infine, un elevato valore di Ki67

Tabella 1

Caratteristiche clinico-patologiche dei sottotipi "triplo negativo" del tumore della mammella nei casi studiati

	BLBC (n=63) n (%)	QNBC (n=43) n (%)	P
Età, anni [media (DS)]	58 (16)	57 (12)	0,78
Stato mestruale			
Non conosciuto	13 (45)	7 (32)	0,49
Fisiologico	11 (38)	12 (54)	
Post-chirurgico	5 (17)	3 (14)	
Sito neoplasia			
Dx	33 (59)	17 (39)	0,14
Sx	22 (39)	24 (56)	
Bilaterale	1 (2)	2 (5)	
Sottotipo istologico			
Duttale	42 (69)	28 (68)	0,09
Lobulare	0 (0)	3 (7)	
Altri sottotipi	19 (31)	10 (24)	
Dimensione			
≤2 cm	31 (51)	22 (54)	0,78
>2 cm	30 (49)	19 (46)	
pT			
T1-T2	54 (87)	38 (91)	0,75
T3-T4	8 (13)	4 (9)	
pN			
N0-N1	47 (82)	31 (76)	0,41
N2-N3	10 (18)	10 (24)	
Grado			
1	4 (6)	2 (5)	0,28
2	13 (21)	4 (9)	
3	46 (73)	36 (86)	
Stadio			
I	13 (23)	13 (33)	0,40
II	30 (54)	16 (40)	
III	13 (23)	11 (27)	
Necrosi			
Presente	24 (41)	12 (29)	0,19
Assente	34 (59)	30 (71)	
Infiltrato linfocitario			
Presente	21 (40)	24 (58)	0,08
Assente	31 (40)	17 (42)	
Invasione linfo-vascolare			
Presente	18 (35)	10 (24)	0,26
Assente	34 (65)	32 (76)	
Margini di infiltrazione			
Presente	3 (8)	1 (4)	0,56
Assente	35 (92)	23 (96)	
Ki67			
≤35%	41 (67)	21 (51)	0,11
>35%	20 (33)	20 (49)	
Chirurgia			
Mastectomia	19 (35)	12 (28)	0,51
Tumorectomia	1 (2)	2 (5)	
Quadrantectomia	31 (56)	28 (65)	
Combinata	4 (7)	1 (2)	
EGFR			
Positivo	50 (79)	0	<0,0001
Negativo	13 (21)	43 (100)	
CK5/6			
Positivo	45 (71)	0	<0,0001
Negativo	18 (29)	43 (100)	

BLBC, carcinoma della mammella "basal-like"; QNBC, carcinoma della mammella "quintuplo negativo"; pT, valutazione dell'estensione del tumore primitivo; pN, valutazione delle metastasi linfonodali; Ki67, indice di proliferazione cellulare; EGFR, "epidermal growth factor receptor"; CK5/6, citocheratina 5/6.

Tabella 2

Associazione tra parametri clinico-patologici e sopravvivenza globale

	"Hazard ratio"	95% IC	P
Sottotipo			
QNBC	Rif		
BLBC	3,26	0,98–10,1	0,054
Età alla diagnosi			
≤50 anni	Rif		
>50 anni	2,53	0,52–12,4	0,25
Grado			
I/II	Rif		
III	0,63	0,15–2,55	0,52
Tipo istologico			
Altri	Rif		
Duttale	1,71	0,34–8,53	0,51
Dimensioni			
≤2 cm	Rif		
>2 cm	3,25	1,28–8,30	0,013
Stadio			
1	Rif		
2	1,09	0,18–6,47	0,92
3	2,70	0,51–14,2	0,24
Infiltrato linfocitario			
Negativo	Rif		
Positivo	0,38	0,08–1,85	0,23
Ki67			
≤35%	Rif		
>35%	0,098	0,094–0,099	0,026

IC, intervallo di confidenza; QNBC, carcinoma della mammella "quintuplo negativo"; Rif., riferimento; BLBC, carcinoma della mammella "basal-like"; Ki67, indice di proliferazione cellulare.

si è dimostrato un fattore prognostico indipendente per una ridotta OS (HR: 0,098, 95% CI: 0,094-0,099, P=0,026).

Profili di espressione dei miRNA

L'analisi dei profili di espressione ha previsto una prima normalizzazione ed eliminazione dei miRNA non espressi, che ha permesso di rilevare differenze di espressione in 100 miRNA nei campioni BLBC, QNBC e NBT. Questi risultati sono stati sottoposti a un'analisi di "clustering" gerarchico, che ha distintamente separato i campioni NBT dai campioni tumorali. Il gruppo di campioni tumorali è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi, BLBC e QNBC (Figura 1). La libreria SAM ha consentito di identificare una differenza di espressione statisticamente significativa per il miR-135b, iperespresso

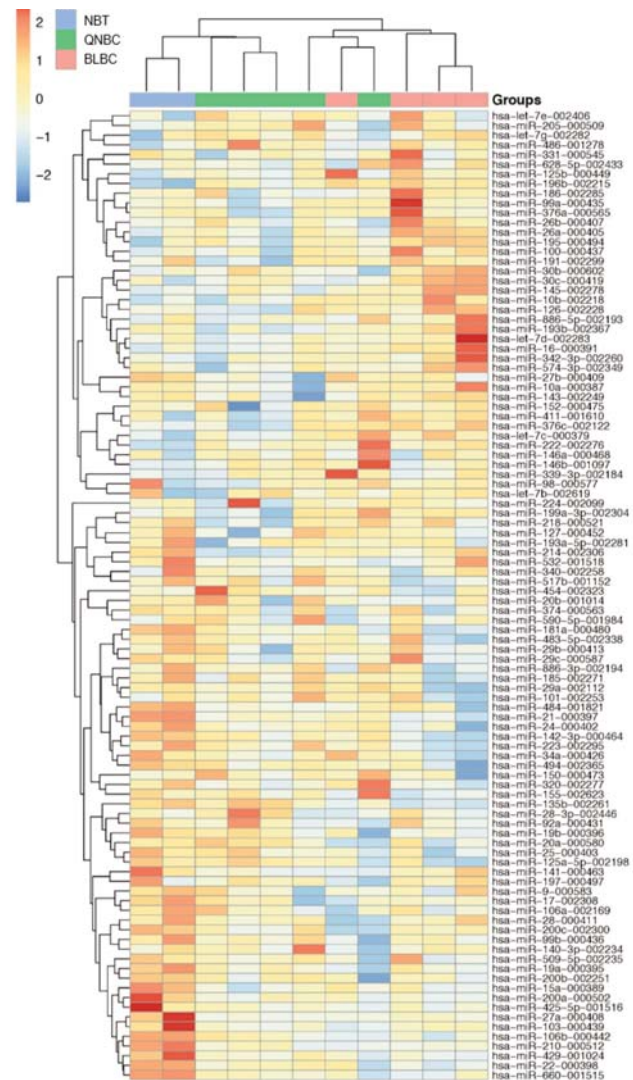


Figura 1 "Clustering" gerarchico del carcinoma della mammella "basal-like" (BLBC), carcinoma della mammella "quintuplo negativo" (QNBC) e tessuto mammario sano (NBT).

nei BLBC rispetto ai QNBC (P=0,011).

Per validare la differenza di espressione del miR-135b è stata eseguita un'analisi di qRT-PCR su una coorte indipendente di BLBC, QNBC e NBT, i cui risultati hanno confermato i dati dell'array". I risultati ottenuti evidenziavano un valore mediano di espressione del miR-135b uguale a 4,50 (intervallo interquartile, 2,79/5,61) nei BLBC, 1,98 (intervallo interquartile, -1,16/3,95) nei QNBC e di -1,14 (intervallo interquartile, -1,82/-0,89) negli NBT. Il livello di espressione di miR-135b era rispettivamente maggiore di 2,27 volte nei BLBC rispetto ai QNBC (P=0,007). Inoltre, il miR-135b era maggiore di 3,9 volte nei BLBC rispetto al tessuto mammario sano (P=0,04). Nessuna significatività era stata riscontrata tra i QNBC e il tessuto mammario sano. I risultati della qRT-PCR sono rappresentati nella Figura 2.

L'analisi di regressione lineare per valutare la presenza di associazione tra l'espressione di miR-135b e i fenotipi tumorali analizzati ha consentito di identificare un'associazione significativa con Ki67 ($P=0,0013$) e una correlazione positiva tra i due parametri ($P=0,003$). Nessun altro parametro analizzato ha mostrato associazioni statisticamente significative con l'espressione di miR-135b, tranne una correlazione inversa con l'età della paziente alla diagnosi ($P=0,031$) (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Il TNBC rappresenta una difficile sfida terapeutica visto il comportamento clinico aggressivo e la prognosi infausta che caratterizza questa variante di BC.

L'identificazione dei miRNA come regolatori dell'espressione genica ha permesso di valutarne il ruolo nella biologia dei tumori e di proporli come possibili indicatori diagnostici, prognostici e potenziali bersagli terapeutici. Lu et al. hanno provato la validità dell'analisi dei profili di espressione dei miRNA come strumenti di maggiore precisione nella classificazione dei tumori rispetto all'impiego dei profili di espressione genica (16). In questo studio è stata eseguita un'analisi del miRNoma umano su campioni di pazienti affetti da TNBC, che ha consentito l'identificazione dell'iperespressione del miR-135b nei BLBC rispetto a QNBC e NBT. I nostri risultati dimostrano, per la prima volta, che l'espressione del miR-135b è uno strumento utile per classificare dal punto di vista molecolare i TNBC in sottotipi "basal-like" e "non-basal-like". La valutazione dell'espressione di miR-135b rappresenta un ulteriore livello di analisi per lo sviluppo di nuove potenziali strategie di trattamento per varianti neoplastiche attualmente prive di efficaci opzioni terapeutiche.

Studi svolti ad analizzare il ruolo dei miRNA nel BC hanno consentito di identificare l'esistenza di specifiche "miRNA expression signatures" correlate con l'espressione di ER, PR e HER2, a sostegno di un loro potenziale utilizzo nella classificazione molecolare del BC (17). In particolare, l'espressione di miR-135b mostra una correlazione inversa rispetto ai livelli di espressione della proteina ER (17–20). Hua et al. hanno dimostrato che miR-135b iperespresso si comporta da oncogene

nel BC contribuendo a favorire la proliferazione, l'invasione, la migrazione e il ciclo cellulare (21). Infine, Arigoni et al. hanno dimostrato l'associazione tra espressione di miR-135b, ridotta OS e metastatizzazione precoce nei pazienti affetti da BC (22).

In accordo con i risultati di Enerly et al., che hanno descritto diverse "miRNA expression signatures" tra BC con differente indice proliferativo (18), i risultati ottenuti in questo studio dimostrano il coinvolgimento di miR-135b nel favorire l'aggressività e la progressione dei TNBC, evidenziando un'associazione significativa e una forte correlazione positiva tra espressione di miR135-b e Ki67.

Al presente, la gestione clinica dei pazienti affetti da TNBC si basa sull'utilizzo di indicatori prognostici e predittivi riferiti alle caratteristiche clinico-patologiche della malattia. La suddivisione dei TNBC in gruppi biologicamente e clinicamente differenti sarebbe sicuramente più accurata con l'ausilio dell'immunoistochimica che consente di definire sottotipi "surrogati" di BC. Questo approccio consentirebbe una

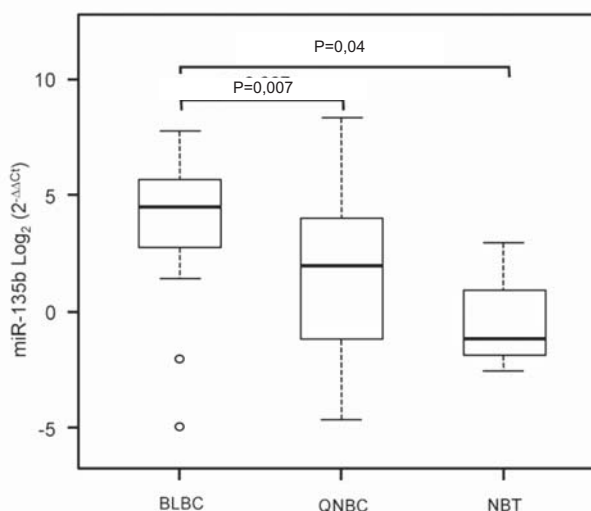


Figura 2

Livelli di espressione di miR-135b in pazienti affetti da carcinoma della mammella "basal-like" (BLBC), carcinoma della mammella "quintuplo negativo" (QNBC) e in tessuto mammario sano (NBT).

Tabella 3

Associazione dei livelli di espressione di miR-135b con le caratteristiche clinico-patologiche del tumore

Caratteristica	Analisi di regressione		Analisi di correlazione	
	β	P	ρ	P
Età	-0,82	0,17	-0,326	0,031
Ki67	0,94	0,0013	0,434	0,003
Stadio	4,28	0,81	0,070	0,65
Grado	1,50	0,95	0,239	0,12
Dimensioni (cm)	0,567	0,57	0,222	0,15

migliore selezione biologica della neoplasia e, di conseguenza, strategie terapeutiche più mirate per il paziente.

Nel nostro studio, 59,4% dei TNBC esprime uno o entrambi i marcatori basali. Sebbene i nostri risultati non evidenzino differenze significative tra le caratteristiche clinico-patologiche dei BLBC rispetto ai QNBC, i pazienti affetti da BLBC mostrano un aumento del rischio di morte rispetto ai QNBC. Questi risultati supportano l'ipotesi che esistono differenze biologiche effettive tra questi sottogruppi di BC e sottolineano il significato prognostico e terapeutico della definizione del fenotipo "basal-like" nei pazienti affetti da TNBC. A sostegno di tale ipotesi, Choi et al. hanno dimostrato che i pazienti affetti da QNBC mostrano una riduzione dell'OS rispetto ai pazienti affetti da BLBC, sebbene questi ultimi se non trattati con chemioterapia mostrano una peggiore prognosi rispetto ai primi (10). Questi dati confermano che l'identificazione di marcatori basali consente di selezionare quei pazienti che maggiormente beneficiano della chemioterapia.

In conclusione, il nostro studio evidenzia la complessità molecolare dei TNBC e definisce, per la prima volta, che l'espressione di miR-135b è strettamente correlata con i TNBC caratterizzati da fenotipo "basal-like". La correlazione positiva tra iperespressione di miR-135b ed elevato Ki67 nei TNBC può associare la prima all'aggressività clinica del tumore. Inoltre, i nostri risultati contribuiscono a rafforzare il significato prognostico dell'espressione dei marcatori basali, in associazione ai classici parametri patologici come le dimensioni e l'indice proliferativo del tumore.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il gruppo "High Performance Computing" del Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori della Sardegna (CRS4) per il supporto tecnico. Questo lavoro è stato supportato dalla Fondazione del Banco di Sardegna.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2014;23:409–22.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747–52.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869–74.
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008;123:236–40.
- Prat A, Adamo B, Cheang MCU, et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 2013;18:123–33.
- Lehmann BDB, Bauer JJ, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750–67.
- Guo L, Lu Z. The fate of miRNA strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One* 2010;5:1–9.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522–31.
- Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2016;1:15004.
- Choi YL, Oh E, Park S, et al. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. *BMC Cancer* 2010;10:507.
- Colditz G, Chia KS, Wilson C, et al. Invasive breast carcinoma: introduction and general features. In: Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al., eds. *WHO classification of tumours of the breast*, 4th ed. IARC: Lyon, 2012:14–31.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367–74.
- Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 1996;5:299–314.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:5116–21.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8.
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11:R27.
- Enerly E, Steinfeld I, Kleivi K, et al. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors. *PLoS One* 2011;6:e16915.
- Aakula A, Leivonen SK, Hintsanen P, et al. MicroRNA-135b regulates ER α , AR and HIF1AN and affects breast and prostate cancer cell growth. *Mol Oncol* 2015;9:1287–300.
- Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 2007;16:R106-13.
- Hua K, Jin J, Zhao J, et al. miR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2. *Int J Oncol* 2016;48:1997–2006.
- Arigoni M, Barutello G, Riccardo F, et al. MiR-135b coordinates progression of ErbB2-driven mammary carcinomas through suppression of MID1 and MTCH2. *Am J Pathol* 2013;182:2058–70.

Utilità dell'elettroforesi urinaria come metodo di screening per la ricerca della proteina di Bence Jones

Maria Teresa Muratore, Luca Fringuelli, Renato Carrozza

UOC Laboratorio Analisi, Ospedale Belcolle, Azienda Sanitaria Locale, Viterbo

ABSTRACT

Utility of the urine electrophoresis as screening test for the detection of Bence Jones protein. Urine immunofixation (uIFE) is the gold standard method to detect the Bence Jones protein (BJP), but is time consuming. We investigated if the urine protein electrophoresis (uEF) can be used to select samples to be immunofixed, verifying its diagnostic accuracy. During a 5-month period, we analyzed 993 urinary samples performing both uEF and uIFE on agarose gels. Two trained operators evaluated independently the gels comparing results of the two techniques. uEF was considered negative when no protein or only the albumin band were visible; any other pattern was classified as positive. 528 samples were negative and 272 were positive with both methods; 12 false negative results were observed with uEF, but only one of these showed a BJP quantification methods >10 mg/L (the recommended sensitivity threshold). A positive predictive value of 60% and a negative predictive value of 97% were calculated for uEF. In order to evaluate the concordance with the uIFE, we calculated the Cohen's k coefficient: the results showed a moderate agreement with a Cohen's k coefficient of 0,594. uEF could be an alternative tool to facilitate the diagnostic pathway for the PBJ detection, provided that the technique is at high resolution and sensitive. In particular, uEF could be used as a first step test to select the samples to be immunofixed.

INTRODUZIONE

La proteina di Bence Jones (PBJ), costituita da catene leggere libere monoclonali di tipo κ o λ , è presente nelle urine per uno sbilanciamento nella produzione delle catene leggere libere rispetto alle catene pesanti determinato dalla proliferazione di un clone plasmacellulare (1). Il numero delle richieste di questo esame nel laboratorio ospedaliero è abbastanza elevato: spesso la ricerca di PBJ, necessaria all'interno della gestione del paziente con discrasia plasmacellulare (2-6), è ancora inappropriatamente richiesta in previsione di un esame radiologico che preveda l'utilizzo di un mezzo di contrasto, in conflitto con quanto indicato nel documento di consenso tra SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica nel 2014 (7).

Per la determinazione di PBJ, le linee guida disponibili raccomandano l'immunofissazione (uIFE): una tecnica necessaria per la tipizzazione immunologica e per la valutazione della monoclonalità della proteina, ma impegnativa in termini temporali e di impegno di personale (1, 8).

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare le caratteristiche in termini di sensibilità e specificità

dell'elettroforesi urinaria ad alta risoluzione (uEF) rispetto a uIFE (considerata come riferimento); si è indagato se uEF possa rappresentare un esame di primo livello accettabile per la discriminazione tra campioni positivi e negativi per PBJ da sottoporre a uIFE.

MATERIALI E METODI

1001 campioni di urina, provenienti da 817 pazienti, pervenuti consecutivamente al nostro laboratorio con la richiesta di PBJ da dicembre 2014 ad aprile 2015, sono stati sottoposti a uEF e uIFE. Circa metà dei pazienti (n=419) avevano una componente monoclonale (CM) sierica; per i restanti campioni la motivazione della richiesta di PBJ è rimasta sconosciuta. Entrambe le metodiche sono state eseguite in gel di agarosio, utilizzando i kit specifici per uEF e uIFE di Interlab su strumento G26 dello stesso fornitore. I campioni, centrifugati e non concentrati, sono stati analizzati secondo le indicazioni del produttore, eccetto che per le corse di uIFE ridotte a 3 per ogni campione [antisiero trivalente anti-catene pesanti $\gamma\alpha\mu$ (GAM), anti- κ , anti- λ]. Era aggiunta una corsia con la catena leggera libera

Corrispondenza a: Maria Teresa Muratore, Laboratorio Analisi, Ospedale Belcolle, Strada Sammartinese, 01100 Viterbo. Tel. 0761339630, Fax 0761339908, E-mail mariateresamuratore@gmail.com

Ricevuto: 05.05.2017

Revisionato: 28.06.2017

Accettato: 29.06.2017

Publicato on-line: 28.07.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.029

coinvolta nei campioni nei quali si evidenziava una CM intera, per escludere la presenza di una PBJ co-migrante.

I risultati di uEF e di uIFE eseguite in parallelo sui campioni freschi sono stati valutati in modo indipendente da due operatori esperti: le uEF sono state valutate come negative o positive prima che i campioni venissero sottoposti all'uIFE. In caso di disaccordo tra i due operatori relativamente al giudizio di positività o negatività della uEF rispetto alla possibile presenza di PBJ, il relativo risultato era escluso. Erano scartati per questo motivo 8 campioni, portando i campioni esaminati a 993. Sono stati considerati negativi solo i campioni i cui traccianti non evidenziavano alcuna proteina oppure era evidente la sola banda albuminica; tutti gli altri casi sono stati refertati come positivi. uIFE era considerata positiva per PBJ quando si evidenziava la presenza di una CM κ o λ non accompagnata da una corrispondente CM sulla corsia dell'antisiero anti-GAM nella stessa posizione. Se uIFE evidenziava una CM intatta (catena pesante più catena leggera), il campione veniva cimentato con la catena leggera libera corrispondente; in caso di positività veniva refertata la presenza della immunoglobulina intera accompagnata da PBJ co-migrante; in caso di mancata reazione, il campione era considerato negativo per PBJ.

La quantificazione della PBJ, tipizzata dall'uIFE, è stata eseguita in nefelometria (Free Light Chains kappa e Free Light Chains lambda, New Scientific Company, su nefelometro BNII Siemens). Insieme alla misura della catena leggera libera coinvolta, è stata eseguita anche la determinazione delle proteine totali urinarie (precipitazione con acido tricloroacetico al 20% su BNII Siemens). Considerata la scarsa accuratezza del metodo immunochimico, ogni valore di PBJ ottenuto è stato confrontato con il valore delle proteine totali e i risultati di uEF.

Sono stati calcolati sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo dell'uEF come test di screening per PBJ e, mediante il programma Analyse-it+ Microsoft Excel, la sua concordanza con uIFE attraverso il calcolo del coefficiente k di Cohen.

Durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata e applicata la Dichiarazione di Helsinki.

Tabella 1

Concordanza tra le due metodiche valutate per la ricerca della proteinuria di Bence Jones

		Immunofissazione urinaria			
		Pos	Neg		
Elettroforesi urinaria	Pos	272	181	453	
	Neg	12	528	540	
		284	709	993	
Concordanza complessiva					0,806
Kappa di Cohen ^a					0,596

^aInterpretazione: concordanza scarsa per $k < 0,20$; modesta tra $0,21$ e $0,40$; moderata tra $0,41$ e $0,60$; buona tra $0,61$ e $0,80$; eccellente $> 0,80$.

RISULTATI

540 campioni sono risultati negativi all'uEF; di questi 528 sono stati confermati come negativi dall'uIFE e 12 sono risultati positivi per PBJ, tutti di tipo κ . Sono stati refertati come positivi all'uEF 453 campioni; di questi, 272 sono stati confermati positivi e 181 sono risultati negativi all'uIFE (Tabella 1). Il confronto tra i due metodi ha evidenziato per uEF una sensibilità del 95%, una specificità del 74%, un valore predittivo negativo del 97%, un valore predittivo positivo del 60% e una concordanza di 0,806, con una k di Cohen di 0,596 (Tabella 1).

Le determinazioni delle catene leggere libere κ dei campioni risultati negativi all'uEF e positivi all'uIFE erano comprese nell'intervallo 1,9-16 mg/L. Di questi 12 campioni con uEF negativa e PBJ positiva, 11 presentavano una CM sierica (Tabella 2) e uno apparteneva a un paziente che non era nel nostro archivio e del quale non si sono potute recuperare informazioni aggiuntive.

DISCUSSIONE

Le linee guida raccomandano la ricerca e la quantificazione della PBJ al primo riscontro di CM nel siero, nel sospetto clinico di alcune discrasie plasmacellulari, nel monitoraggio della terapia del mieloma multiplo, dell'amiloidosi AL e della malattia da deposito delle catene leggere (2-6). Raccomandano altresì che il metodo utilizzato per la sua ricerca e la sua quantificazione sia il più possibile sensibile, anche senza ricorrere alla concentrazione del campione. Il metodo di riferimento per la ricerca della PBJ è l'uIFE, che evidenzia la monoclonalità della proteina e la caratterizza immunologicamente (1, 8). Nel nostro laboratorio, uIFE viene eseguita su 3 corsie utilizzando l'antisiero trivalente (anti-GAM), più anti- κ e anti- λ ; non vengono utilizzati antisieri anti-catene leggere libere che possono essere a basso titolo, a scarsa avidità e presentare cross reattività con le catene leggere legate (1, 8, 9). Il loro uso è limitato a quei casi in cui uIFE evidenzia una CM nella corsia della catena leggera e del trivalente nella stessa posizione, al fine di verificare la

Tabella 2

Caratteristiche degli 11 campioni negativi alla ricerca della proteina di Bence Jones all'elettroforesi urinaria e positivi all'immunofissazione

n	Componente monoclonale sierica	Intervallo di concentrazione della componente monoclonale
6	IgG κ	1-17 g/L
2	IgA κ (migrazione in zona β)	Non determinabile
2	IgM κ	4-16 g/L
1	IgG κ (migrazione in zona β) + IgM κ	Non determinabile (IgG κ); 3 g/L (IgM κ)

possibile presenza di una proteina di PBJ co-migrante.

Pur così semplificata, uIFE rimane un esame impegnativo dal punto di vista del tempo necessario e dell'impegno di personale. Poter disporre di un metodo di screening sufficientemente sensibile per escludere i campioni sicuramente negativi sarebbe, di conseguenza, un valido supporto. A tal fine, abbiamo messo a confronto uEF (da usare come esame di screening) con uIFE (metodo di riferimento): i risultati ottenuti dal nostro lavoro dimostrano una buona concordanza complessiva tra i due metodi. Il valore predittivo negativo di uEF è alto (97%), mentre il valore predittivo positivo è solo del 60%. Questo peraltro deriva in parte dai criteri ristretti utilizzati per la classificazione di uEF: per aumentare la sensibilità dell'esame abbiamo valutato come negativi solo i campioni con assenza di qualsiasi banda proteica o con la presenza della sola banda albuminica.

Le linee guida per la ricerca della PBJ indicano come limite di sensibilità adeguato quello di 10 mg/L (1, 8, 10); il fatto che dall'analisi delle misurazioni dei 12 campioni risultati negativi a uEF e positivi a uIFE solo uno presentasse valori al di sopra di tale limite (16 mg/L), ci sembra quindi un buon risultato, tanto da ritenere in complesso uEF un valido approccio di screening per selezionare i campioni da sottoporre a uIFE, permettendo al contempo una veloce refertazione dei campioni negativi. Si potrebbe argomentare che se uno di questi 12 campioni fosse appartenuto a un paziente con amiloidosi sospetta o in monitoraggio, non identificare correttamente la presenza di PBJ, avrebbe rappresentato un problema rilevante ai fini della valutazione clinica. Nel caso specifico, uno di questi pazienti con uEF negativa e uIFE positiva era in monitoraggio per una amiloidosi AL renale, ma la concentrazione della sua PBJ era talmente bassa (5,8 mg/L), che l'ematologo, da noi interpellato, non ha ritenuto significativa la sua eventuale mancata segnalazione.

L'ideale, per poter decidere con sicurezza quali campioni sottoporre allo screening e quali processare direttamente con uIFE sarebbe, come in generale per tutti gli esami di laboratorio, poter conoscerne il motivo della richiesta, ma questo è difficilmente ottenibile nella pratica quotidiana.

Relativamente alla misura della concentrazione urinaria di PBJ, sono necessarie alcune considerazioni. Per la quantificazione di PBJ, le raccomandazioni indicano la densitometria della CM riscontrata in uEF rapportata al valore delle proteine totali urinarie; questa procedura tuttavia espone a due tipi di errore, uno dovuto all'inaccuratezza della lettura densitometrica (interferenza del rumore di fondo, comigrazione della PBJ con altre bande proteiche o con la CM intatta), l'altro ai problemi legati alla determinazione delle proteine totali urinarie e all'impossibilità di scendere al di sotto di un certo limite di sensibilità. Anche i metodi immunochimici presentano problematiche (gli antisieri potrebbero non reagire sempre in modo lineare con le catene monoclonali che costituiscono la PBJ del campione, è sempre possibile l'eventualità dell'eccesso di antigene, la PBJ può presentarsi in diversi stati di aggregazione con

affinità diverse per l'antisiero) (9). In questo studio è stata sempre verificata la congruità del risultato della misura immunochimica con l'entità della PBJ come appariva all'uEF e con la concentrazione delle proteine totali urinarie.

In conclusione, l'alto valore predittivo negativo rilevato e le concentrazioni molto contenute delle PBJ nei campioni classificati come falsamente negativi sembrano indicare uEF come un buon metodo di screening da utilizzare per la selezione dei campioni da sottoporre a uIFE. Il nostro studio, condotto per una durata di 5 mesi, ha evidenziato come lo screening per PBJ eseguito attraverso uEF abbatta di ~50% il numero delle uIFE da eseguire. Questo si traduce in un importante riduzione di impegno temporale del personale tecnico, un risparmio economico e un accorciamento dei tempi di refertazione, senza compromissione del significato clinico dei risultati ottenuti.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Graziani MS, Merlini GP, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. Gruppo di Studio Proteine-Società Italiana di Biochimica Clinica. *Biochim Clin* 2001;25:23-32.
2. Bird J, Cavenagh J, Hawkins P, et al. On behalf of UK Myeloma Forum. Guidelines on the diagnosis and management of AL amyloidosis. *Br J Haematol* 2004;125:681-700.
3. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini GP, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
4. Berenson JR, Kenneth KC, Audell RA, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. A consensus statement. *Br J Haematol* 2010;50:28-38.
5. Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK Myeloma Working Group (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): Guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J Haematol* 2009;147:22-42.
6. Dismopoulos M, Kyle R, Fernand GP, et al. Guidelines for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-5.
7. Mussap M, Graziani M, Caldini A, et al. Documento di consenso SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) sulla richiesta di esami di laboratorio per la valutazione del danno renale da mezzi di contrasto. *Biochim Clin* 2014;38:140-2.
8. Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. *Biochim Clin* 2014;38:47-53.
9. Natali P, Patelli G, Tagliavini S, et al. Accuratezza dell'immunonefelometria come metodo di screening per la determinazione della proteinuria di Bence Jones. *Biochim Clin* 2017;41:148-53.
10. Mussap M. La ricerca della proteina di Bence Jones tra vecchi problemi e recenti raccomandazioni: considerazioni in margine alle linee guida italiane e americane. *Biochim Clin* 2002;26:49-54.

Verso l'armonizzazione dell'analisi delle urine con striscia reattiva: il ruolo di un programma di VEQ

Sandra Secchiero¹, Maria Grazia Epifani², Mario Plebani^{1,2}

¹Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, e ²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

ABSTRACT

Towards harmonization in dipstick urinalysis: the role of EQAS. We reviewed the results of our 2013 to 2016 EQAS to evaluate the performance of the most used dipstick urinalysis methods in Italy. 67,450 results from 32 control samples were analyzed by using a normalized scale. For pH, the mean of the most frequent results was $72.1\% \pm 15.6$. For specific gravity, the mean for values <1.020 Kg/L was $77.9\% \pm 9.5$. For glucose detection, in negative samples $97.4\% \pm 3.1$ of dipsticks provided correct results, while for samples with 300-500 mg/L, $10.8\% \pm 6.2$ provided negative results, mainly Siemens dipsticks. For proteins, in negative samples $99.7\% \pm 0.2$ of dipsticks supplied correct results, but for samples with 100-250 mg/L of proteins $25.6\% \pm 10.7$ still resulted negative. For hemoglobin, in negative samples $94.8\% \pm 5.5$ of dipsticks provided correct results; for samples with 0.1-0.3 mg/L $10.0\% \pm 0.8$ of dipsticks resulted negative. For ketones, in negative samples $99.8\% \pm 0.2$ of dipsticks provided correct results; however, Uropaper Alpha3-9L never revealed their presence in positive controls. For leucocyte esterase, in negative samples $97.6\% \pm 0.9$ of dipsticks provided correct results. For nitrites, results were consistent both with negative and positive controls ($99.3\% \pm 0.6$). For protein/creatinine ratio, in samples with ~ 150 mg/g $14.3\% \pm 5.3$ of dipsticks provided a normal ratio. The study demonstrates the importance of an EQAS in providing to participants an evaluation of their performance and a reliable view of the degree of harmonization among results of different types of dipsticks.

INTRODUZIONE

L'armonizzazione in medicina di laboratorio ha come obiettivo finale il miglioramento degli esiti del paziente attraverso la produzione di informazioni di laboratorio accurate. I risultati degli esami eseguiti da laboratori diversi sullo stesso campione devono poter essere confrontati con affidabilità per garantire coerente interpretazione (1, 2). Ciò è valido per determinazioni di tipo quantitativo, ma anche per determinazioni di tipo semiquantitativo, come quelle utilizzate per l'esame chimico-fisico delle urine su striscia reattiva, che dovrebbero fornire risultati omogenei all'interno di uno stesso intervallo di lettura.

Da un recente questionario del Gruppo interdisciplinare laboratorio e clinica dell'apparato urinario (GIAU) è emerso come l'algoritmo diagnostico utilizzato nell'esame chimico-morfologico delle urine preveda nel 99% dei casi l'utilizzo della striscia, congiuntamente all'esame microscopico o morfologico automatizzato (3). Il confronto con altri laboratori che utilizzano o meno lo

stesso tipo di striscia mediante la partecipazione a un programma di VEQ è pertanto di fondamentale importanza. Tuttavia, i programmi di VEQ per l'esame chimico-fisico delle urine mediante striscia reattiva sono poco diffusi e ciò è dovuto al fatto che, mentre la riferibilità e la stima dell'incertezza di misura sono ben stabilite nelle misure biochimiche, questi concetti sono ancora poco applicabili per le determinazioni di tipo semiquantitativo o su scala ordinale utilizzate per l'esame delle urine (4, 5). Molti schemi VEQ per l'analisi mediante "dipstick" prendono in considerazione risultati solo di tipo qualitativo, raggruppandoli in una scala lineare (ad es., assente, tracce, positivo) ed esistono pochi programmi che utilizzano i risultati numerici corrispondenti (6-11).

Il programma di VEQ gestito dal Centro di Ricerca Biomedica (CRB) è nato nel 2000 e conta su una partecipazione di ~ 290 laboratori distribuiti su tutto il territorio nazionale (11). Lo scopo del nostro studio è stato di comparare in parallelo i risultati forniti dai partecipanti in 4 anni di VEQ (2013-2016) per pH, densità relativa, glucosio, proteine, emoglobina, chetoni, esterasi

Corrispondenza a: Sandra Secchiero, Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio c/o UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Università di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova. Tel.: 0498214491; Fax 0498217916; E-mail sandra.secchiero@aopd.veneto.it

Ricevuto: 10.05.2017

Revisionato: 28.06.2017

Accettato: 05.07.2017

Pubblicato on-line: 01.08.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.037

leucocitaria, nitriti, creatinina e rapporto proteine/creatinina per valutare il grado di armonizzazione delle principali strisce reattive presenti sul mercato italiano.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche del programma di VEQ

Il programma di VEQ gestito dal CRB è nato nel 2000 con il patrocinio di SIBioC, Società Italiana di Patologia Clinica e di Medicina di Laboratorio (SIPMeL) e Società Italiana di Nefrologia (SIN) e nel 2010 è stato accreditato dalla "Clinical Pathology Accreditation". Recentemente, è stato anche avviato il processo di adeguamento ai requisiti della norma ISO 17043:2010 per il suo accreditamento.

Attualmente, il programma prevede l'invio di 8 campioni liofilati (4 esercizi), prodotti esclusivamente per il CRB sulla base delle concentrazioni indicate dal coordinatore del programma. I campioni vanno ricostituiti con 10 mL di acqua bidistillata seguendo le istruzioni riportate nella confezione.

I partecipanti inseriscono i risultati in una maschera del sito web CRB predisposta per ciascun costituente del pannello analitico con la scala di lettura propria della striscia utilizzata. Ad es., per il glucosio, se un laboratorio utilizza le strisce A. Menarini Diagnostics Uriflet 9UB, esso potrà scegliere uno dei seguenti risultati: 0, 10, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 300, 500, >1000, mentre se utilizza le strisce Siemens Atlas Pro12 potrà scegliere tra 0, 100, 250, 500, >1000. Per tutti gli analiti, ad eccezione dei nitriti, vengono quindi raccolti dati numerici. Se nella pratica clinica i partecipanti utilizzano una scala ordinale devono convertire il risultato nelle corrispondenti concentrazioni indicate nel foglietto illustrativo del

sistema analitico utilizzato (ad es., per le proteine totali: 2+ = 1500 mg/L).

Il rapporto periodico consta di due parti. Nella prima parte, per ciascun parametro, viene riportato il risultato del laboratorio e quello più frequente (moda) fornito dai partecipanti che utilizzano la stessa striscia con relativa percentuale di risposte. La moda rappresenta quindi il valore "target" ed è utilizzata per il confronto con il valore del singolo laboratorio. La variabilità interlaboratorio per gli utilizzatori dello stesso tipo di striscia si può dedurre dal numero di laboratori (espresso in %) che forniscono il risultato corrispondente alla moda. La concordanza massima si raggiunge quando tutti i laboratori forniscono lo stesso valore e più bassa è la percentuale di risultati uguali più alta sarà quindi la variabilità interlaboratorio.

Trattandosi di misure semiquantitative non viene espresso il giudizio sulla prestazione analitica; tuttavia, se il risultato fornito da un laboratorio si discosta notevolmente da quello più frequente ottenuto con lo stesso tipo di striscia, il CRB notifica al laboratorio il riscontro di una prestazione non soddisfacente (PNS). In particolare, un risultato viene segnalato come PNS quando per lo stesso tipo di striscia: a) risulta positivo in campioni negativi e viceversa o b) si discosta almeno di due classi rispetto alla moda. Questo tipo di segnalazione pertanto non viene effettuata nel caso in cui tutti i risultati di una determinata striscia si discostano da tutti gli altri.

La seconda parte del rapporto periodico include per ciascun parametro sia la distribuzione di frequenza dei risultati relativi a tutti gli utilizzatori della stessa ditta fornitrice sia la distribuzione di frequenza di tutti i risultati dei partecipanti al programma su scala normalizzata (Figura 1). Quest'ultima, scelta arbitrariamente dal

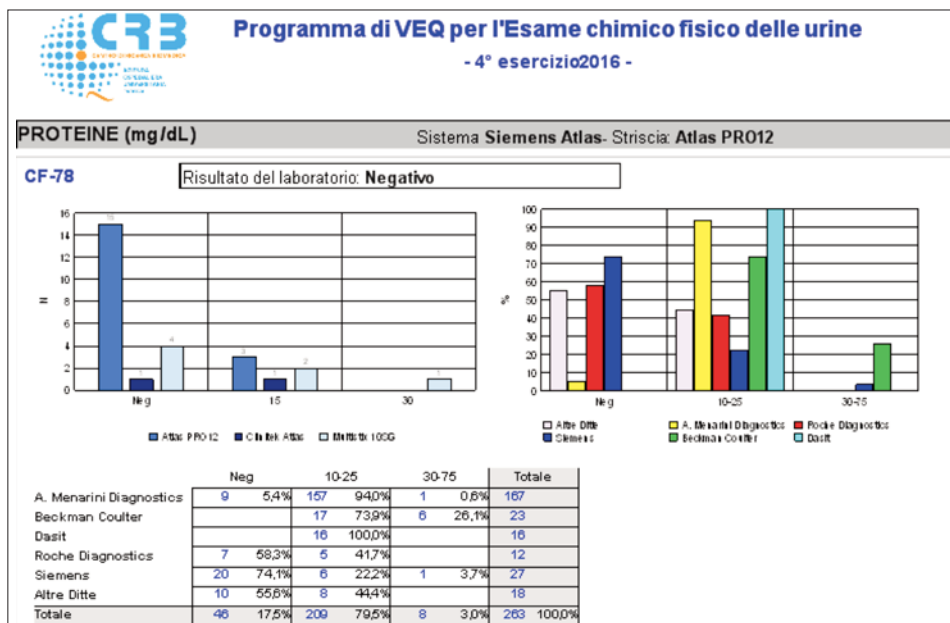


Figura 1 Esempio di rapporto periodico della VEQ, che riporta la distribuzione di frequenza dei risultati relativi a tutte le strisce della ditta fornitrice (istogramma di sinistra) e la distribuzione di frequenza di tutti i risultati su scala normalizzata (istogramma di destra).

coordinatore del programma, si rende necessaria per operare un confronto tra le diverse strisce poiché i produttori non prevedono le medesime scale di lettura (Tabella 1). Questa parte del rapporto periodico è particolarmente importante perché permette un confronto diretto tra i risultati delle diverse strisce commerciali e ciascun partecipante può valutare le prestazioni dei "dipstick" in uso nel suo laboratorio rispetto a quelle di tutti gli altri.

Campioni

Sono stati valutati i risultati relativi a 32 campioni di controllo distribuiti nei cicli 2013 - 2016 a ~290 laboratori, con numerosità media di risposte per esercizio di 265. I campioni, costituiti da urine umane liofilizzate senza aggiunta di stabilizzanti o conservanti, sono preparati *ad hoc* da Eurotrol B.V. e sono forniti con un certificato d'analisi che riporta l'intervallo di misura per ciascun parametro, determinato con strisce Uriflet S 9UB su strumento Aution Max AX-4280 (A. Menarini Diagnostics). Per la creatinina i valori sono ottenuti con metodo al picrato alcalino su Beckman AU400.

Sui campioni di controllo sono state inoltre eseguite presso il laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova le determinazioni della glicosuria con metodo esochinasi su strumentazione Roche Cobas 8000 e della proteinuria con metodo al pirogallolo su strumentazione Siemens Dimension Vista.

Analisi statistica

Sono stati analizzati 67.450 risultati così distribuiti: pH = 7836; densità relativa = 8127; glucosio = 8356; proteine = 8379; emoglobina = 8387; chetoni = 8410, esterasi leucocitaria = 8014; nitriti = 8283; creatinina = 855; rapporto proteine/creatinina = 803. Per ogni

parametro è stata calcolata la media (espressa in percentuale) delle risposte più frequenti (moda) dei risultati appartenenti alla stessa classe normalizzata, indipendentemente dalla striscia utilizzata dal laboratorio. E' stato inoltre effettuato il calcolo della k di Cohen, con la seguente valutazione della concordanza tra i risultati dei diversi "dipstick": K <0,20 = scarsa; 0,21-0,40 = limitata; 0,41-0,60 = moderata; 0,61-0,80 buona; 0,81-1,00 = ottima. Inoltre, per ogni parametro è stata calcolata la percentuale di PNS e, conseguentemente, la media di PNS riscontrate nei 4 cicli di VEQ presi in esame.

RISULTATI

Il numero di partecipanti nel periodo 2013-2016 era compreso tra 281 e 294. Nel ciclo 2016, il tipo di strisce utilizzate dai partecipanti alla VEQ era il seguente: A. Menarini Diagnostics Uriflet S 9UB = 55,6%, A. Menarini Diagnostics Aution Sticks = 8,3%; Beckman Coulter iChemVelocity = 7,5%; Dasit Uropaper Alpha 3-9L = 4,7%; Dirui serie H = 4,7%, Medical System Uriscan = 2,9%, Roche Cobas = 0,7%, Roche UrYSIS = 4,3%; Siemens Atlas = 8,2%, Siemens Multistix = 2,9%.

Nella Tabella 2 è riportata per ogni parametro la media delle risposte più frequenti (in %) per risultati appartenenti alla stessa classe normalizzata, indipendentemente dalla striscia utilizzata dal laboratorio. Nella Tabella 3 sono riportati i risultati relativi alla creatinina e al rapporto proteine/creatinina, suddivisi per tipologia di striscia.

Nella Tabella 4 è riportata, per ogni parametro, la percentuale di PNS segnalate al laboratorio, cioè la percentuale di risultati che si discostavano notevolmente da quelli più frequenti ottenuti con lo stesso tipo di striscia.

Tabella 1

Esempio di scala normalizzata per l'elaborazione dei risultati relativi alle proteine

Classe	1	2	3	4	5	6	7
Intervallo, mg/L	Negativo	100-250	300-750	1000-2000	2500-5000	>5000	≥10000
A. Menarini Diagnostics Aution	Neg 50	100 150 200	300 500 700	1000 1500 2000	2500 3000 4000	6000	10000
A. Menarini Diagnostics Uriflet	0 50	100 200	300 500 700	1000 1500 2000	2500 3000 4000	>4000	
Beckman Coulter iChemVelocity	Neg	100	300 500	1000	3000	≥6000	
Dasit Uropaper Alpha3-9L	Nor	150	300	1000	3000		10000
Medical Systems Uriscan	Neg	100	300	750 1000	2000	3000	5000 10000
Dirui serie H	Neg	150	300	1000	3000	>5000	
Roche Cobas	Neg		250	750 1500		5000	
Roche Combur	Neg		200	750 1500		5000	
Roche UrYSIS	Neg		250	750 1500		5000	
Siemens Atlas	Neg	150	300	1000		≥3000	≥10000
Siemens Multistix	Neg	150	300	1000		>3000	

Tabella 2

Risultati relativi ai 32 campioni di VEQ distribuiti nei cicli 2013-2016

pH			Densità relativa (kg/L)			Glucosio (mg/L)			Proteine (mg/L)		
n	Classe	Frequenza (%)	n	Classe	Frequenza (%)	n	Classe	Frequenza (%)	n	Classe	Frequenza (%)
3	5	86,8±7,6	4	1,006-1,010	77,6±9,8	5	Neg	97,4±3,1	4	Neg	99,7±0,2
5	5,5	67,9±17,2	8	1,011-1,015	78,6±3,5	4	300-500 ^a	58,3±7,0	4	100-250	72,1±9,9
4	6	55,4±12,5	5	1,016-1,020	76,8±16,3	9	700-1000	68,0±17,3	12	300-750	82,2±3,3
5	6,5	65,6±15,3	4	1,021-1,025	58,1±15,4	7	1500-2500 ^b	65,9±10,3	4	1000-2000	80,6±6,4
15	7	77,3±13,0	11	1,026-1,030	63,0±9,2	5	3000-5000	71,4±12,6	7	2500-5000	72,8±12,3
						2	>10.000	69,3±9,3	1	>5000	50,6
k = 0,622; ES = 0,007			k = 0,629; ES = 0,006			k = 0,570 ^c ; ES = 0,007			k = 0,690 ^c ; ES = 0,006		
Emoglobina (mg/L)			Chetoni (mg/L)			Esterasi leucocitaria (Leu/μL)			Nitriti		
n	Classe	Frequenza (%)	n	Classe	Frequenza (%)	n	Classe	Frequenza (%)	n	Classe	Frequenza (%)
9	Neg	94,8±5,5	4	Neg	99,8±0,2	4	0	97,6±0,9	17	Neg	99,6±0,4
3	0,1-0,3	68,1±10,7	10	50-250	73,5±15,1	14	10-25	63,1±9,0	14	Pos	99,0±0,7
8	0,6-1,5	76,4±14,1	14	300-600	62,6±11,1	8	70-100	64,5±10,9	1 ^e	-	51,0
7	2-5	64,2±12,5	4	800-1000 ^d	49,4±3,2	4	125-250	53,5±6,5			
5	6-10	62,7±9,1				2	500	58,0±12,4			
k = 0,561 ^c ; ES = 0,008			k = 0,466 ^c ; ES = 0,008			k = 0,450 ^c ; ES = 0,008			k = 0,968 ^c ; ES = 0,003		

^aQuesta classe non è presente nelle strisce Siemens.^bQuesta classe non è presente nelle strisce Roche.^ck calcolata per i campioni positivi.^dPer le strisce Siemens il massimo valore è 400 mg/L.^eQuesto campione è risultato positivo per 51% e negativo per 49%.**Tabella 3**

Risultati relativi alla creatinina e al rapporto proteine/creatinina, suddivisi per tipologia di strisce

Creatinina (mg/dL)					Proteine/creatinina (mg/g)				
n	Valori assegnati	Classe	Frequenza (%)	Frequenza (%)	n	Valori assegnati	Classe	Frequenza (%)	Frequenza (%)
	Beckman AU400		A. Menarini Aution Sticks 10PA	Siemens Atlas PRO12		Dimension Vista/AU400		A. Menarini Aution Sticks 10PA	Siemens Atlas PRO12
4	14,1±0,1	10	88,9±22,2	19,3±31,7	3	Pnorm:Cdil	Pnorm:Cdil	100±0	13,5±13,7
1	27	50	100	84,6	4	<80	Norm	87,5±21,7	97,8±2,2
4	94,2±2,6	100	97,2±5,6	2,3±2,7	8	148,0±16,5	150	93,9±11,5	83,1±8,6
4	204,0±3,5	200	0	0	8 ^a	336,5±20,9	300	0	11,1±10,8
15	301,7±21,7	>300	0	92,4±13,7	8	1416±211	>500	100±0	14,1±9,5
4	492,0±21,2	>300	54,2±59,4	100±0					

^aPer un altro campione con un valore assegnato di 370 mg/g, 96% delle strisce Atlas PRO12 ha fornito un valore di 300 mg/g, mentre 66,7% delle Aution Sticks10PA ha fornito un rapporto >500 mg/g.**pH**

I valori di pH dei campioni erano compresi tra 5 e 7. I risultati hanno evidenziato una percentuale media di risposte comprese nella stessa classe pari a 72,1% (± 15,6%) con un intervallo compreso tra 41,0% e 95,2% (k = 0,62). Le PNS sono state pari a 1% nei 4 cicli di VEQ.

Densità relativa

Per valori <1,020 kg/L si è evidenziata una percentuale media di risposte comprese nella stessa classe pari a 77,9% con una k di Cohen di 0,67. Per valori >1,020 kg/L la concordanza di risposte scendeva a 61,7%, con una k di Cohen di 0,33. Generalmente, le

Tabella 4

Numero di prestazioni non soddisfacenti in percentuale segnalate ai laboratori partecipanti alla VEQ

	2013	2014	2015	2016	Media	DS
pH	1,1	1,0	1,4	0,6	1,0	0,32
Densità relativa	1,3	1,4	2,2	1,7	1,7	0,42
Glucosio	2,0	2,1	2,1	1,8	2,0	0,17
Proteine	1,2	1,3	2,0	1,3	1,4	0,35
Emoglobina	2,1	3,1	2,7	2,6	2,6	0,39
Chetoni	1,6	2,0	2,2	1,2	1,8	0,44
Esterasi leucocitaria	2,6	3,0	4,3	2,1	3,0	0,94
Nitriti	1,0	0,5	0,3	0,6	0,6	0,31
Creatinina	0	3,7	2,2	6,5	3,1	2,72
Rapporto proteine/creatinina	2,1	4,9	5,8	5,0	4,4	1,61

strisce Aution Sticks 10EA hanno fornito valori inferiori alla moda, mentre le strisce Multisticks 10SG hanno fornito i valori più elevati. Complessivamente, nel periodo di studio le PNS sono state pari a 1,7%.

Glucosio

Per i campioni negativi (n=5) la percentuale media di risposte corrette è risultata pari a 97,4%, mentre per i campioni positivi (n=27) la percentuale di risposte comprese nella stessa classe si abbassava a un valore medio di 66,8%, con una k di Cohen di 0,57. Per campioni con concentrazioni di glucosio comprese tra 300 e 500 mg/L, si è osservata una percentuale di risultati negativi pari a 10,8% a carico prevalentemente delle strisce Siemens, le quali passando in modo discontinuo da 0 a 1000 mg/L non rilevano concentrazioni intorno a 300 mg/L. In caso di campioni negativi, i risultati falsamente positivi erano prevalentemente a carico delle strisce Beckman Coulter iChemVelocity, le quali hanno fornito risultati più elevati rispetto alle altre strisce in tutto l'intervallo di concentrazione. Oltre a questo tipo di prestazioni non in linea con tutti gli altri risultati, le PNS sono state pari a 2,0% nei 4 cicli di VEQ. Il confronto con i valori di glucosio ottenuti in chimica liquida ha evidenziato una buona concordanza in termini di moda, relativamente alle diverse classi di lettura dei "dipstick". Per esempio, un campione con una concentrazione di glucosio di 20 mg/L è risultato negativo per 99,6% dei "dipstick"; un campione con 790 mg/L di glucosio è risultato compreso nella classe 700-1000 per 84,3% dei "dipstick"; un campione con 2050 mg/L è risultato compreso nella classe 1500-2500 per 77,2% dei "dipstick"; un campione con 3350 mg/L di glucosio è risultato compreso nella classe 3000-5000 per 73,3% dei "dipstick". Per campioni con concentrazioni di glucosio non comprese in alcuna classe di lettura (ad es., 1350 mg/L) i risultati dei "dipstick" si sono distribuiti equamente tra le due classi limitrofe: 53,6% nella classe 1500-2500 mg/L e 44,9% nella classe 700-1000 mg/L.

Proteine (albumina)

Per i campioni negativi (n=4), la percentuale media di risposte corrette è risultata molto elevata (99,7%). Tuttavia, per campioni con concentrazioni di proteine comprese tra 100 e 250 mg/L si è osservata una percentuale di risultati falsamente negativi pari a 25,6%. In particolare, le strisce Medical System Uriscan hanno fornito risultati negativi in una percentuale pari a 90,0%±14,4 e le strisce Roche Urisys in una percentuale pari a 72,6%±12,2. Oltre a questi risultati falsamente negativi, le PNS sono state pari a 1,4% nei 4 cicli di VEQ. Il confronto con i valori di proteine totali ottenuti in chimica liquida ha evidenziato un'ottima concordanza con i valori dei "dipstick" in termini di moda relativa alle diverse classi di lettura. Per esempio, un campione con una concentrazione di proteine totali <50 mg/L è risultato negativo per 92% dei "dipstick"; un campione con 210 mg/L di proteine totali è risultato compreso nella classe 100-250 per 79,5% dei "dipstick"; 2 campioni con 480 e 560 mg/L sono risultati compresi nella classe 300-750 per 84,6% dei "dipstick"; un campione con 1760 mg/L è risultato compreso nella classe 1000-2000 per 85,7% dei "dipstick".

Creatinina

Il valore della creatinina su strisce Atlas PRO12 e Aution Sticks10PA è stato confrontato con il valore ottenuto dalla determinazione quantitativa su Beckman AU400 (Tabella 3). Per concentrazioni di creatinina di ~15 mg/dL, 88,9% (±22,2) delle strisce Aution Sticks10PA ha fornito valori pari a 10 mg/dL, mentre 73,9 (±27,1) delle Atlas PRO12 ha fornito valori pari a 50 mg/dL. Per campioni con una concentrazione di creatinina di ~100 mg/dL, 97,2% (±5,6) delle strisce Aution Sticks10PA ha fornito valori pari a 100 mg/dL, mentre 85,4% (±20,2) delle Atlas PRO12 ha fornito valori pari a 200 mg/dL. Per campioni con concentrazioni di creatinina di ~200 mg/dL, né le strisce Aution Sticks10PA né le Atlas PRO12 hanno fornito

questo risultato, bensì 100 mg/dL e 300 mg/dL, rispettivamente. Per campioni con una concentrazione di creatinina di ~300 mg/dL, 88,6% ($\pm 24,3$) delle strisce Aution Sticks10PA ha fornito valori pari a 200 mg/dL, mentre 92,4% ($\pm 13,2\%$) delle Atlas PRO12 ha fornito valori ≥ 300 mg/dL. Infine, per campioni con una concentrazione di creatinina di ~500 mg/dL le Atlas PRO12 hanno fornito valori ≥ 300 mg/dL nel 100% dei casi, mentre le Aution Sticks10PA per 2 campioni hanno fornito prevalentemente valori di 200 mg/dL. Le PNS sono state pari a 3,1% nei 4 cicli di VEQ.

Rapporto proteine/creatinina

Alcune strisce multireattive utilizzano, oltre al "pad" convenzionale per le proteine, un'area reattiva per la determinazione delle proteine a bassa concentrazione e sono in grado di rilevare il rapporto proteine/creatinina (12). Tuttavia, la numerosità dei partecipanti alla VEQ che fornisce i risultati di questo rapporto è circa un decimo del totale.

Il rapporto proteine/creatinina su strisce Atlas PRO12 e Aution Sticks10PA è stato confrontato con il valore calcolato dalla determinazione quantitativa di proteine e creatinina. Per campioni con rapporto < 80 mg/g ($n=7$), le strisce hanno fornito l'indicazione esatta nel 83,5% ($\pm 14,9$) dei casi e per il rimanente 16,0% l'indicazione era Pnorm:Cdil. Per campioni con un rapporto di ~150 mg/g, solo nel 85,8% ($\pm 6,2$) dei casi si è osservato un rapporto proteine/creatinina di 150 mg/g, mentre nel 14,3% ($\pm 5,3$) il rapporto è risultato normale. Questi valori falsamente negativi si sono verificati tutti, a eccezione di uno, a carico delle strisce Atlas PRO12. Per campioni con un rapporto di ~300 mg/g, nel 85,8% ($\pm 8,9$) dei casi si è osservato un risultato inferiore, pari a 150 mg/g. Solo per un campione con un rapporto di 370 mg/g, il 96,0% delle strisce Atlas PRO12 ha fornito un rapporto di 300 mg/g, mentre 66,7% delle Aution Sticks10PA ha fornito un rapporto > 500 mg/g. Infine, per campioni con un rapporto proteine/creatinina > 1000 mg/g, le Aution Sticks10PA hanno fornito sempre valori > 500 mg/g, mentre le strisce Atlas PRO12 hanno fornito questi valori solo in una percentuale pari al 14,1% ($\pm 9,5$), fornendo invece un valore di 150 mg/g come rapporto più frequente (66,3%). Oltre a questi risultati, le PNS sono state pari al 4,4% nei 4 cicli di VEQ.

Emoglobina

Per i campioni negativi ($n=9$) la percentuale media di risposte corrette è risultata pari a 94,8%, mentre per campioni positivi la percentuale di risposte appartenenti alla stessa classe di lettura si abbassava a un valore medio di 68,7%. In presenza di campioni con emoglobina compresa tra 0,1 e 0,3 mg/L ($n=3$), complessivamente 10% delle strisce ha fornito valori negativi. Tra i "dipstick" Atlas PRO12 la percentuale di risultati negativi sale al 57,2%. Di contro, in campioni negativi, le strisce Dasit Uropaper Alpha3-9L hanno fornito risultati francamente positivi, compresi quasi esclusivamente nella classe 0,6-1,5 mg/L. Da queste

osservazioni sono escluse le strisce Roche e Dirui perché continuano a utilizzare come unità di misura Ery/ μ L e non forniscono indicazioni sulla scala espressa in mg/L. Oltre ai risultati falsamente negativi o falsamente positivi sopradescritti, le PNS sono state pari a 2,6% nei 4 cicli di VEQ.

Chetoni

Per i campioni negativi ($n=4$), la percentuale media di risposte corrette è stata del 99,8%; per le altre classi, la percentuale di risposte scendeva progressivamente (Tabella 2). Va precisato che per le strisce Siemens il massimo valore fornito corrisponde a 400 mg/L, per cui la classe 800-1000 non comprende i risultati relativi a queste strisce. Le strisce Dasit Uropaper Alpha3-9L non hanno mai rilevato la presenza di chetoni, anche in campioni francamente positivi; le strisce Beckman Coulter iChemVelocity hanno fornito risultati che prevalentemente erano compresi in una classe precedente rispetto a quella contenente la moda, mentre le strisce Roche Urysis in una classe successiva. Oltre ai risultati falsamente negativi delle strisce Uropaper Alpha3-9L, le PNS sono state pari a 1,8% nei 4 cicli di VEQ.

Esterasi leucocitaria

Per campioni privi di esterasi leucocitaria ($n=4$), la concordanza tra laboratori, indipendentemente dalla striscia utilizzata, è risultata pari al 97,6%, mentre per campioni positivi la percentuale di risposte comprese nella stessa classe si abbassava drasticamente a un valore medio del 61,7%. Le strisce Medical Systems Uriscan non hanno rilevato esterasi leucocitaria in campioni con 70 - 100 Leu/ μ L e anche in campioni con valori > 100 Leu/ μ L hanno fornito risultati compresi prevalentemente in una classe precedente rispetto a quella contenente la moda. Di contro le strisce Dirui serie H hanno fornito risultati che tendenzialmente erano compresi in una classe successiva rispetto alla classe contenente la moda. Oltre ai risultati falsamente negativi delle strisce Uriscan, le PNS sono state pari a 3,0% nei 4 cicli di VEQ.

Nitriti

Per i nitriti la percentuale media di risposte corrette nei campioni analizzati è risultata pari al 99,3%. Solo per un campione si sono riscontrati valori contraddittori, ma concordi per tipo di striscia. Conseguentemente, la media di PNS è stata la più bassa: 0,6%.

DISCUSSIONE

La determinazione del pH urinario ha una notevole importanza per il laboratorio perché consente di interpretare meglio le altre reazioni chimiche e di valutare correttamente le cristallurie e l'eventuale batteriuria. Per il clinico è un utile indicatore per valutare le necessità di trattamento e l'efficacia dello stesso in

pazienti con nefrolitiasi. E' noto tuttavia che il pH misurato su scala ordinale, con step di 0,5 unità, ha una scarsa accuratezza rispetto al pH misurato con il pHmetro (13, 14). L'intervallo di pH studiato non era molto ampio poiché, pur trattandosi di campioni di controllo preparati *ad hoc*, risulta molto difficile ottenere valori di pH >7 rispettando le concentrazioni richieste per gli altri parametri. I risultati del nostro studio dimostrano che mediamente più di ¼ dei risultati si colloca in una classe diversa da quella in cui è compresa la moda, anche se, nella maggior parte dei casi, si tratta di classi limitrofe e quindi con differenze di pH <0,5 unità. Solo 1% di risultati ha presentato differenze >0,5 unità.

La concentrazione dei soluti nelle urine è un indicatore di notevole valenza clinica quale indice dello stato di idratazione o della capacità del rene di gestire l'equilibrio idro-elettrolitico. Il metodo utilizzato nei "pad" reattivi dei "dipstick" si basa sulla determinazione degli ioni (principalmente sodio, potassio, cloruri e ammonio) e sono note interferenze in riduzione da parte del pH alcalino, del glucosio e di urea >1 g/L e interferenze in aumento in presenza di proteinuria >5 g/L. Il confronto con altri metodi, quali la misura dell'osmolalità o la rifrattometria, rivela una scarsa accuratezza della strisce reattive (15), tuttavia, il loro utilizzo sembra costituire un valido aiuto per controllare e mantenere un volume di urine ottimale in pazienti con nefrolitiasi (16). I risultati ottenuti nel nostro studio evidenziano una buona concordanza tra i valori forniti dai vari tipi di strisce reattive fino a 1,020 kg/L, ma una limitata concordanza per valori >1,020 kg/L.

Negli ultimi anni l'utilità clinica della determinazione del glucosio nelle urine è stata fortemente ridimensionata; tuttavia, la glicosuria è ancora utilizzata in alcune patologie nefrologiche. Soprattutto, la ricerca del glucosio urinario viene inserita, insieme ai chetoni, in un profilo dedicato in modo specifico ai soggetti pediatrici nella prima infanzia, quando le oggettive difficoltà a ricorrere ai prelievi ematici rendono più frequente il ricorso alla glicosuria come primo esame nel sospetto clinico di diabete (17). I risultati della nostra VEQ, in analogia a quelli di altri autori (18, 19), dimostrano che la determinazione è troppo imprecisa per un'accurata misura quantitativa della glicosuria, ma sufficiente per escludere la presenza di glucosio nelle urine.

Le linee guida "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) (20, 21), sulla scorta di molteplici studi ed evidenze, indicano come la presenza di proteine nelle urine rappresenti un fattore prognostico negativo sia per lo sviluppo di malattia renale cronica che per il rischio cardiovascolare, già a concentrazioni comprese tra 100 e 300 mg/L di albumina (oppure, utilizzando il rapporto albumina/creatinina, tra 10 e 30 mg/mmol), quando ancora la velocità di filtrazione glomerulare risulti nei limiti fisiologici. Ne consegue che una precoce rilevazione dell'albuminuria (e/o proteinuria) con metodi sensibili e accurati può costituire l'arma più efficace per una diagnosi precoce di malattia renale e per la prevenzione cardiovascolare.

Va ricordato che il termine proteine totali, relativamente ai "dipstick", non è propriamente corretto, poiché il metodo utilizzato è sensibile prevalentemente alla presenza di albumina e transferrina. Tuttavia, il confronto con i valori di proteine totali ottenuti in chimica liquida ha evidenziato un'ottima concordanza con i valori dei "dipstick" in termini di moda relativa alle diverse classi di lettura. L'albumina determinata in chimica liquida negli stessi campioni risultava invece nettamente inferiore. Penders et al. (22) prima e Decavele et al. (23) successivamente hanno investigato le prestazioni di alcune strisce del commercio (Roche Combur test strip) e hanno ipotizzato un loro utilizzo come screening per l'albuminuria. Altri studi hanno dimostrato che i "dipstick" hanno un alto valore predittivo negativo nello screening dell'albuminuria nella popolazione generale (24, 25). I risultati della VEQ evidenziano che per i campioni negativi, in effetti, la percentuale media di risposte corrette era molto elevata (99,7%). Tuttavia, per campioni con concentrazioni di proteine comprese tra 100 e 250 mg/L, si osservava un'alta percentuale di risultati falsamente negativi (25,6%). Le strisce meno sensibili si sono rivelate essere le Medical System Uriscan e le Roche Urisys. Oltre ai ben noti limiti di sensibilità, bisogna ricordare che la maggior parte dei "dipstick" determina le proteine in valore assoluto, senza alcuna correlazione con la concentrazione del campione urinario; pertanto, urine molto diluite possono dare proteinurie falsamente negative e, al contrario, urine fortemente concentrate possono rilevare una proteinuria significativa senza che questa in realtà superi i limiti fisiologici (26, 27). E' opportuno quindi che il risultato della determinazione delle proteine urinarie sia espresso come rapporto con la creatinuria quale indicatore di concentrazione urinaria (2, 3, 20, 21, 28). Trattandosi di un metodo semplice, poco costoso e rapido, la chimica secca su "dipstick" si è diffusa in tutti i laboratori e attualmente può essere considerata il metodo maggiormente utilizzato per la determinazione delle proteine (albumina) nelle urine, nonostante i limiti che questo metodo presenta (metodo semiquantitativo, numerosi interferenti, scarsa o nulla sensibilità per le globuline, mancata rilevazione della proteinuria di Bence Jones). Va largamente caldeggiato altresì l'utilizzo di "dipstick" che permettano la refertazione della proteinuria come rapporto con la creatinina quale indicatore di concentrazione. Esse utilizzano, a fianco del "pad" basato sulla variazione di un indicatore sensibile al pH (con possibili interferenze in caso di pH alcalino), un'area reattiva per la determinazione delle proteine o dell'albumina a bassa concentrazione (~100 mg/L). Inoltre, presentano un "pad" per la determinazione semiquantitativa della creatinina. Per la creatinina i dati della VEQ evidenziano una discordanza tra i 2 tipi di strisce: i valori delle strisce Aution Sticks10PA correlano meglio con le determinazioni in chimica liquida fino a 100 mg/dL di creatinina, mentre le Atlas PRO12 tendono a sovrastimare; per concentrazioni ≥300 mg/dL, le Aution Sticks10PA sottostimano fornendo per tutti i campioni (a eccezione

di 2 con creatinina >500 mg/dL) valori di 200 mg/dL. Per il rapporto proteine/creatinina, le strisce hanno presentato una buona specificità: i campioni con concentrazioni fisiologiche (rapporto <80 mg/g creatinina) sono stati individuati nel 99,4% dei casi. Questi dati sono in linea con il lavoro di Hermida et al. (29), condotto con "dipstick" Atlas PRO12, nel quale 97,2% di campioni con un rapporto "normale" mostrava un valore <30 mg/g se misurato con metodi quantitativi. Tuttavia, per campioni con un rapporto di ~150 mg/g le strisce hanno fornito valori falsamente negativi nel 14,3% dei casi. Infine, per rapporti >150 mg/g si sono riscontrate le seguenti criticità: a) rapporti intorno ai 300 mg/g sono stati sottostimati da entrambi i tipi di striscia e b) le strisce Atlas PRO12 in campioni nei quali erano presenti valori molto elevati di proteine contestualmente a valori molto elevati di creatinina spesso non fornivano un rapporto accurato in termini analitici quantitativi (rapporti >300 o >500 mg/g sono risultati pari a 150 mg/g). Ciò senza inficiare il valore clinico di allarme nell'identificazione di proteinuria: risultavano infatti corretti i singoli valori relativi a proteine e creatinina, inquadrando in maniera appropriata la situazione clinica. Per queste limitazioni le linee guida indicano che la determinazione della proteinuria con "dipstick" andrebbe limitata a situazioni in cui non sia possibile effettuare una determinazione più accurata in chimica liquida (3). C'è un grande dibattito in corso sull'accuratezza diagnostica del rapporto proteine/creatinina con "point-of-care" come test di screening per l'investigazione di proteinuria significativa (30-34). Le linee guida KDIGO danno le seguenti indicazioni: la determinazione delle proteine urinarie deve essere eseguita sul mitto intermedio del primo campione del mattino, con metodi sensibili in chimica liquida e il risultato espresso in rapporto alla concentrazione delle urine. In ordine di preferenza vengono suggeriti: rapporto albumina/creatinina (esame di prima scelta nell'adulto), rapporto proteine/creatinina (esame di prima scelta nel bambino), "dipstick" (2).

Con i "dipstick" si ricerca l'emoglobinuria, cioè la presenza di emoglobina libera, mentre in microscopia o in citofluorimetria si ricerca la presenza di eritrociti nelle urine. Tutti i metodi in "dipstick" per la determinazione dell'emoglobinuria si basano sull'attività pseudo-perossidasi dell'anello tetrapirrolico completo dell'atomo di ferro centrale (protoporfirina IX). False negatività possono essere ricondotte all'interferenza dell'acido ascorbico, che tende a legare il perossido sottraendolo alla reazione, mentre false positività possono essere ricondotte all'attività di perossidasi batteriche e/o leucocitarie. Lo screening per l'ematuria è raccomandato in molte situazioni, ad es., in medicina del lavoro nello screening di pazienti ad alto rischio. Un recente lavoro ha dimostrato addirittura la superiorità del "dipstick" rispetto all'analisi microscopica per lo screening di ematuria (35). Le linee guida raccomandano, tuttavia, di associare al "dipstick" la valutazione microscopica e/o strumentale della frazione corpuscolata poiché non è possibile escludere la presenza di ematuria con il solo "dipstick" (36). Anche

dai risultati di questo studio emerge che in presenza di campioni con emoglobina compresa tra 0,1 e 0,3 mg/L il 10% delle strisce ha fornito valori falsamente negativi. Le strisce meno sensibili si sono rivelate essere le Siemens Atlas PRO12, che hanno fornito risultati falsamente negativi in una percentuale pari a 57,2%. Di contro le strisce Dasit Uropaper Alpha3-9L hanno fornito risultati falsamente positivi, compresi nella classe 0,1-0,3 mg/L o 0,6-1,5 mg/L, in campioni negativi. Nel nostro studio abbiamo considerato solo i risultati espressi in mg/L. Le linee guida raccomandano infatti l'espressione dei risultati in mg/L (3), anche se a tutt'oggi si registra ancora una grande disomogeneità nella refertazione dell'emoglobina con i test su striscia: scale descrittive (tracce, leggero, ecc.), scale +/-, concentrazioni (mg/dL, Ery/ μ L). Sarebbe opportuno che le ditte Roche e Dirui convertissero al più presto l'unità di misura da Ery/ μ L a mg/L. Il beneficio sarebbe triplice: a) renderebbe comprensibile all'utente il referto per l'emoglobina in ogni area territoriale senza errori di decodifica, b) renderebbe omogenea l'elaborazione dei dati nei programmi di VEQ permettendo al laboratorio il confronto dei propri risultati con quelli degli altri laboratori, indipendentemente dal tipo di striscia utilizzata, e c) eviterebbe discordanze con l'esame del sedimento nel caso sia presente emoglobinuria in quantità non strettamente correlata al numero degli eritrociti (37).

In genere, con il "dipstick", falsi negativi per i chetoni sono determinati dal fatto che non viene rilevato l'acido β -idrossibutirrico, mentre falsi positivi si osservano in presenza di gruppi sulfidrilici liberi. Pertanto, per una rapida e accurata identificazione di pazienti con chetoacidosi diabetica è consigliato l'utilizzo del dosaggio del β -idrossibutirrico nel siero data la maggior sensibilità rispetto al "dipstick" su urine (38). Anche dai risultati di questo studio emerge che complessivamente in presenza di 50-250 mg/L di chetoni, solo il 73,5% dei "dipstick" ha fornito risultati compresi in questa classe; in particolare, le strisce Roche Urysis tendono a sovrastimare. Le strisce Dasit Uropaper Alpha3-9L hanno fornito risultati negativi per qualsiasi campione di controllo risultato positivo per tutte le altre strisce. Questi dati sono stati resi noti alla ditta produttrice (Eiken Chemical co.) secondo la quale invece solo il loro reagente sarebbe stato ottimizzato per ridurre la probabilità di falsi positivi dovuti alla presenza di gruppi sulfidrilici.

Il riscontro di una leucocituria significativa può indicare la presenza di un'infezione o di una flogosi delle vie urinarie. Le linee guida raccomandano che la determinazione dell'esterasi leucocitaria con "dipstick" sia associata alla ricerca dei leucociti con la microscopia e/o con strumentazione automatica (3). Infatti, dato che la positività dei "dipstick" si verifica in presenza di esterasi rilasciate dai leucociti in corso di degenerazione, in presenza di leucociti giovani, resistenti alla lisi, con nullo o minimo rilascio di esterasi, si può avere leucocituria nel sedimento con negatività all'esterasi. Al contrario, una lisi dei leucociti (dovuta alla bassa concentrazione del campione, all'esposizione a

pH molto alcalino o alla cattiva conservazione del campione) può determinare positività per l'esterasi in assenza di leucociti rilevabili al microscopio ottico o con strumentazione automatica. Sebbene in uno studio abbastanza recente si sia osservata una correlazione significativa tra l'esterasi leucocitaria determinata con Roche Combur-test Mstrip e l'esame al microscopio ottico (39), i risultati della VEQ hanno dimostrato una moderata concordanza (61,7% di risposte comprese nella stessa classe) tra i "dipstick" di diverse ditte in campioni di controllo positivi.

La linea guida raccomanda la ricerca dei nitriti nelle urine per il loro elevato valore predittivo positivo per le infezioni delle vie urinarie (3). La determinazione semiquantitativa dei nitriti con "dipstick" presenta una bassa sensibilità, che tuttavia aumenta se si considerano insieme l'esterasi leucocitaria e/o l'emoglobina (40-42). I risultati del nostro studio hanno evidenziato una concordanza quasi assoluta nelle risposte dei vari "dipstick" per tutti i campioni analizzati, a eccezione di uno.

CONCLUSIONI

L'analisi delle urine con strisce reattive è attualmente il metodo più utilizzato nella prassi di laboratorio per il basso costo, la facilità di esecuzione con strumentazione automatizzata di laboratorio o di tipo "point-of-care". La sensibilità e la specificità diagnostica dei vari tipi di "dipstick" è ben documentata; tuttavia, esistono pochi studi sul confronto dei risultati dei "dipstick" mediante programmi di VEQ. I risultati del nostro studio, relativi agli anni 2013-2016, evidenziano una concordanza non ottimale tra i valori forniti dai vari tipi di strisce reattive per pH e densità relativa. Relativamente alle proteine totali, il confronto con i valori ottenuti in chimica liquida ha evidenziato un'ottima concordanza con i valori dei "dipstick" in termini di moda relativa alle diverse classi di lettura. L'albumina, determinata in chimica liquida negli stessi campioni, è risultata invece di concentrazioni nettamente inferiori. Questi risultati sembrerebbero pertanto smentire il fatto che il metodo utilizzato nei "dipstick" sia sensibile prevalentemente alla presenza di albumina e transferrina; tuttavia, ciò deve essere confermato su campioni di pazienti. Per glucosio, proteine, emoglobina, esterasi leucocitaria e chetoni, in campioni di controllo negativi si è osservata una concordanza $\geq 95\%$. Per campioni di controllo in cui l'analita è presente "in tracce", si possono riscontrare risultati falsamente negativi. Ciò è dovuto al fatto che i "dipstick" hanno una lettura discontinua e per alcuni manca un passaggio intermedio tra un risultato negativo e il primo risultato semi-quantitativo (ad es., nelle strisce Siemens per il glucosio manca la scala di lettura 300-500 mg/L), ma soprattutto alla minor sensibilità di alcuni "dipstick" rispetto ad altri. Di contro, per glucosio ed emoglobina alcuni "dipstick" possono fornire risultati falsamente positivi dovuti a interferenti. E' quindi fortemente raccomandata la partecipazione a un programma di VEQ perché il confronto con laboratori

che utilizzano lo stesso tipo di "dipstick" permette di monitorare le prestazioni del sistema analitico (strumento + striscia) in uso e l'analisi dei risultati forniti da tutti i tipi di strisce può evidenziare le carenze di un tipo rispetto all'altro per uno o più analiti.

Il programma di VEQ del CRB, pur con i limiti intrinseci derivanti dal dover necessariamente raggruppare in categorie arbitrarie i risultati delle diverse strisce presenti sul mercato, può essere quindi un valido aiuto per tenere sotto controllo l'esame chimico-fisico delle urine. Consente di valutare come la prestazione del singolo laboratorio si colloca nel contesto generale e favorisce la riduzione dell'errore analitico, allertando quando un valore fornito dal laboratorio risulta appartenere a una classe di valori lontana da quella in cui cadono tutti gli altri risultati. Inoltre, permette di evidenziare i limiti analitici propri di ciascun tipo di "dipstick". Una maggior conoscenza di tali limiti è di fondamentale importanza per un loro corretto utilizzo (43, 44), rafforzando la consapevolezza che l'analisi su "dipstick" deve essere integrata con l'analisi microscopica del sedimento urinario e refertata con commenti adeguati a interpretare eventuali discrepanze tra l'analisi chimica e la valutazione morfologica del sedimento.

Non da ultimo, sarebbe auspicabile una produzione armonizzata delle strisce, almeno in termini di scala di lettura. Le ditte produttrici, come in generale in tutti i settori della diagnostica di laboratorio, rimangono infatti tra i principali artefici di un miglioramento a favore dell'armonizzazione dei risultati.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: requests, samples, measurements and reports. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015;15:1-13.
2. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio della malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. *Biochim Clin* 2015;39:617-26.
3. Manoni F, Gessoni G, Fogazzi GB, et al. Esame fisico, chimico e morfologico delle urine: proposta di linee guida per la fase analitica del Gruppo Intersocietario Analisi delle Urine (GIAU). *Biochim Clin* 2016;40:353-82.
4. Guder WG, Boisson RC, Fogazzi G, et al. External quality assessment of urine analysis in Europe. Results of a round table discussion during the symposium "From Uroscopy to Molecular Analysis", Seeon, Germany, September 18-20, 1999. *Clin Chim Acta* 2000;297:275-84.
5. Kouri T, Laippala P, Kutter D, et al. Quality specifications for ordinal scale measurements with multiproperty (multiple) urine test strips. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:523-6.
6. White G. Twelve months' experience of a quality assessment scheme for urine tests using reagent strips. *Ann Clin Biochem* 1995;32:589-90.
7. Orita Y, Ito K, Igarashi S, et al. Report on the accuracy and the reliability of dip sticks. *Rinsho Byori* 1996;44:1100-11.
8. Tighe P. Laboratory-based quality assurance programme

- for near-patient urine dipstick testing, 1990-1997: development, management and results. *Br J Biomed Sci* 1999;56:6-15.
9. Loria A, Mejia M, Hidalgo L, et al. First two years of an external quality assurance program for urinalysis. *Rev Invest Clin* 1998;50:429-33.
 10. Loria A, Mejia M, Granados L, et al. The second biennial of the External Quality Evaluation Program in Urinalysis (PEECU). *Rev Invest Clin* 2002;54:226-30.
 11. Secchiero S, Sciacovelli L, Zardo L, et al. Valutazione esterna di qualità (VEQ) per l'esame chimico fisico delle urine: risultati del programma italiano. *Biochim Clin* 2009;33:391.
 12. Parson M, Newman DJ, Pugia M, et al. Performance of a reagent strip device for quantitation of the urine albumin: creatinine ratio in a point of care setting. *Clin Nephrol* 1999;51:220-7.
 13. Kwong T, Robinson C, Spencer D, et al. Accuracy of urine pH testing in a regional metabolic renal clinic: is the dipstick accurate enough? *Urolithiasis* 2013;41:129-32.
 14. Ilyas R, Chow K, Young GJ. What is the best method to evaluate urine pH? A trial of three urinary pH measurement methods in a Stone Clinic. *J Endourol* 2015;29:70-4.
 15. Costa CE, Bettendorff C, Bupo S, et al. Comparative measurement of urine specific gravity: reagent strips, refractometry and hydrometry. *Arch Argent Pediatr* 2010;108:234-8.
 16. Khorami MH, Hashemi R, Bagherian-Sararoudi R, et al. The assessment of 24-h urine volume measurement of urine specific gravity with dipstick in adults with nephrolithiasis. *Adv Biomed Res* 2012;1:86.
 17. Arvind B, Anurag B, Shina M. Approach to renal tubular disorders. *Indian J Pediatr* 2005;72:771-6.
 18. Bekhof J, Kollen BJ, Groot-Jebbink, et al. Validity and interobserver agreement of reagent strips for measurement of glycosuria. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:248-52.
 19. Bekhof J, Kollen BJ, van de Leur S, et al. Reliability of reagent strips for semi-quantitative measurement of glycosuria in neonatal intensive care setting. *Pediatr Neonatal* 2014;55:444-8.
 20. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl* 2012;2:1-138.
 21. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1-150.
 22. Penders J, Fiers T, Delanghe JR. Quantitative evaluation of urinalysis test strips. *Clin Chem* 2002;48:2236-41.
 23. Decavele ASC, Fiers T, Penders J, et al. A sensitive quantitative test strip based point-of-care albuminuria screening assay. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:673-8.
 24. Wen CP, Yang YC, Tsai MK. Urine dipstick to detect trace proteinuria: an underused tool for an underappreciated risk marker. *Am J Kidney Dis* 2011;58:1-3.
 25. White SL, Yu R, Craig JC, et al. Diagnostic accuracy of urine dipsticks for detection of albuminuria in the general community. *Am J Kidney Dis* 2011;58:19-28.
 26. Lim D, Lee D-Y, Cho SH, et al. Diagnostic accuracy of urine dipsticks for proteinuria in older outpatients. *Kidney Res Clin Pract* 2014;33:199-203.
 27. Samal L, Linder JA. The primary care perspective on routine urine dipstick screening to identify patients with albuminuria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:131-5.
 28. Lamb EJ, Mackenzie F, Stevens P. How should proteinuria be detected and measured? *Ann Clin Biochem* 2009;46:205-17.
 29. Hermida FJ, Soto S, Bemitez AJ. Evaluation of the urine protein/creatinine ratio measured with the dipsticks Clinitek Atlas PRO 12. *Clin Lab* 2016;62:735-8.
 30. McTaggart MP, Price CP, Pinnock RG, et al. The diagnostic accuracy of urine albumin-creatinine ratio point-of-care test for detection of albuminuria in primary care. *Am J Kidney Dis* 2012;60:787-94.
 31. McTaggart MP, Newall RG, Hirst JA, et al. Diagnostic accuracy of point-of-care tests for detecting albuminuria: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;160:550-7.
 32. Chang CC, Su Ming MJ, Ho JL et al. The efficacy of semi-quantitative urine protein-to-creatinine (P/C) ratio for the detection of significant proteinuria in urine specimens in health screening settings. *Springerplus* 2016;5:1791.
 33. Park JI, Baek H, Kim BR, et al. Comparison of urine dipstick and albumin:creatinine ratio for chronic kidney disease screening: a population-based study. *PLoS One* 2017;12:e0171106.
 34. Cassia MA, Pozzi FE, Bascapè S, et al. Proteinuria and albuminuria at point of care. *Nephrology @ point of care* 2016;2:e8-16.
 35. Bataille A, Wetzstein M, Hertig A, et al. Evidence of dipstick superiority over urine microscopy analysis for detection of hematuria. *BMC Res Notes* 2016;9:435-7.
 36. Hoffmann P, Hoffmann C, Ziebig R, et al. Evaluation of the iChem[®] Velocity[™] urine chemistry analyzer in a hospital routine laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:509-13.
 37. Secchiero S, Caleffi A, Fogazzi GB, et al. Indagine conoscitiva sulle modalità di refertazione dell'emoglobina nell'esame chimico fisico delle urine. *RIMeL/IJLaM* 2007;3(Suppl):205. Abstract.
 38. Arora S, Long T, Henderson SO, et al. Diagnostic accuracy of point-of-care testing for diabetic ketoacidosis at emergency-department triage: {beta}-hydroxybutyrate versus the urine dipstick. *Diabetes Care* 2011;34:852-4.
 39. Laosu-angkoon S. The sensitivity and specificity of a urine leucocyte esterase dipstick test for the diagnosis of urinary tract infection in the outpatient clinic of Rajavithi Hospital. *J Med Ass Thai* 2013;96:849-53.
 40. Anuli JS, Clement MI, Basse AE. Comparative diagnosis of urinary tract infection (UTI) using urinary nitrite and significant bacteriuria (SBU). *Int J Med Res Health Sci* 2016;5:6-15.
 41. Mambatta AK, Jayarajan J, Rashme VL, et al. Reliability of dipstick assay in predicting urinary tract infection. *J Family Med Prim Care* 2015;4:265-8.
 42. Wammanda RD, Aikhionbare HA, Ogala WN. Use of nitrite dipstick test in the screening for urinary tract infection in children. *West Afr J Med* 2000;19:206-8.
 43. Ball CL, Church DL, Lyon ME. Quality assurance issues regarding chemical urinalysis. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:462-3.
 44. Cyriac J, Holden K, Tullus K. How to use... urine dipsticks. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2017;102:148-54.

Ruolo e finalità dei laboratori di farmacotossicologia forense

Chiara Laposata, Federica Bortolotti, Rossella Gottardo, Franco Tagliaro

Sezione di Medicina Legale, Laboratorio di Tossicologia Forense, Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Verona

ABSTRACT

Role and objectives of forensic pharmacotoxicology laboratories. The forensic toxicology laboratories produce analytical data on toxic or pharmacological compounds for forensic or administrative aims at the request of public offices, private companies or, less frequently, individuals. Although this definition includes a wide range of applications, the common aspect is to identify and measure analytes in biological samples, collected from a living or deceased person, or in non-biological samples. In forensic toxicology, the detection of xenobiotics in cases of driving under the influence of drugs is the most common investigation. Less frequently, the forensic toxicology laboratory deals with quantitative analysis of drugs in non-biological material. The toxicological investigations of cadaveric specimens are finalized to the detection of toxics or legal and illegal substances in case of fatal intoxication/poisoning or in case of traffic accidents, evaluating if these xenobiotics are the determinant or contributory factors in the cause and manner of death. In this field, where the consequences of an analytical error or misinterpretation of the data can have direct legal and social implications for the person involved in the investigation, the result of toxicological analysis must be particularly characterized by accuracy and reliability. Standards of quality must be applied and scientific and technological skills are mandatory. If not, professionals involved in this activity may incur in liability or criminal prosecution.

INTRODUZIONE

Il laboratorio di farmacotossicologia forense si occupa di fornire dati analitici in materia di composti tossici o di interesse farmacologico a scopo forense o amministrativo, su richiesta di uffici pubblici (autorità giudiziaria, commissioni mediche locali per patenti di guida), enti privati (aziende) o, talora, singoli cittadini. Gli ambiti di applicazione dell'indagine sono molteplici e differenti tra di loro, ma accomunati dall'identificazione e dalla quantificazione di analiti in campioni biologici, prelevati da soggetti viventi o da cadavere; talvolta, l'analisi è effettuata in campioni non biologici.

La tossicologia forense sul vivente si occupa dell'accertamento della presenza/assenza di xenobiotici allo scopo di valutare, in accordo con le attuali norme e riferimenti legislativi, le condizioni elencate nella Tabella 1.

In ambito clinico, il laboratorio di tossicologia forense coadiuva il sanitario nell'identificazione della sostanza/e responsabile/i di quadri di avvelenamento. In tale campo rientrano anche le reazioni avverse conseguenti a errore terapeutico.

Per il configurarsi di ripercussioni penalistiche o

civilistiche, i quadri di intossicazione/avvelenamento di particolare rilevanza medico-legale, che si possono prospettare anche in un contesto clinico, sono rappresentati dall'assunzione di sostanze stupefacenti, dall'esposizione professionale ad agenti chimici, dall'esposizione generica a sostanze tossiche, specialmente coinvolgenti i bambini (negligenza da parte dei genitori) o dalla somministrazione dolosa dei cosiddetti "rape drugs" nei casi di violenza sessuale.

Nonostante la varietà delle condizioni sopra illustrate, la maggior parte delle attività del laboratorio di tossicologia forense è rappresentata dall'analisi dei campioni biologici nei casi di sospetta guida in stato di ebbrezza o sotto l'effetto di sostanze stupefacenti/psicotrope e di quelli prelevati per la verifica dell'idoneità alla patente di guida. Meno frequente il laboratorio di tossicologia forense si occupa, su richiesta dell'autorità giudiziaria o di privati, dell'analisi quali-quantitativa delle sostanze stupefacenti su materiale non biologico. Tali analisi avvengono in attuazione della disciplina inerente alle sostanze stupefacenti e psicotrope (Testo Unico sulla droga - D.P.R. n. 309/90 - aggiornato al D.L. 20 marzo 2014, n. 36, convertito, con modificazioni, dalla L.

Corrispondenza a: Franco Tagliaro, Sezione di Medicina Legale, Laboratorio di Tossicologia Forense, Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Policlinico GB Rossi, Piazzale L.A. Scuro 10, 37134 Verona. Tel. 0458124618-0458124246, E-mail franco.tagliaro@univr.it

Ricevuto: 02.10.2016

Revisionato: 22.11.2016

Accettato: 12.12.2016

Pubblicato on-line: 31.07.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.031

Tabella 1*Finalità dell'indagine tossicologica su vivente*

Ambiti di diagnosi	Riferimenti legislativi
Identificazione delle cause di intossicazione acuta o cronica	-
Idoneità psico-fisica alla guida, finalizzata alla revisione o conseguimento della patente di guida	Artt. 119, 128, 320 del Nuovo Codice della Strada
Disabilità alla guida, con rilievo di stato di ebbrezza o dell'influenza di sostanze stupefacenti e/o psicotrope	Artt. 186 e 187 del Nuovo Codice della Strada
Idoneità lavorativa per mansioni a rischio, subordinata al rilievo dell'assenza di quadri di abuso e/o dipendenza da sostanze psicotrope in lavoratori che svolgono mansioni a rischio	D.P.R. n. 309 del 9 ottobre 1990; D. Lgs 285 del 30 aprile 1992; L. 30 marzo 2001 n. 125; D. Lgs 9 aprile 2008, n. 81; L. 94/2009
Idoneità al porto d'armi	Artt. 1, 2 e 3 del D.M. Sanità 28 aprile 1998 e successive modifiche
Idoneità a particolari norme concorsuali	-
Diagnosi di tossicodipendenza nei detenuti, con conseguenti benefici in ambito detentivo esitanti, talvolta, anche nella sospensione della pena	Art. 96 del D.P.R. 309/90 Testo Unico Stupefacenti
Valutazione astinenza in soggetti sottoposti a programmi terapeutici di mantenimento o disassuefazione	Artt. 75, 120 e 122 del D.P.R. 309/90 Testo Unico Stupefacenti
Adesione al trattamento di soggetti in regime di sospensione del procedimento o di esecuzione della pena o di sostituzione della pena stessa	Artt. 90 e 94 del D.P.R. 309/90 Testo Unico Stupefacenti
Diagnosi di tossicodipendenza della madre durante la gravidanza con conseguenze per la tutela del minore (fino alla dichiarazione di adottabilità)	-
Idoneità all'affidamento dei figli nei casi di separazione coniugale	-
Assenza di sostanze proibite in materia di anti-doping	L. 14 dicembre 2000 n. 376

16 maggio 2014, n. 79). L'analisi comporta la valutazione quali-quantitativa delle sostanze illegali ed eventualmente anche delle sostanze diluenti o adulteranti.

Le finalità dell'indagine tossicologica-forense su cadavere sono solitamente rappresentate dall'identificazione e dalla misurazione del tossico/veleno determinante il decesso (intossicazione/avvelenamento) e dall'identificazione e dalla misurazione degli xenobiotici che hanno influito sullo stato psico-fisico del soggetto, prima del decesso, in determinati eventi, come ad esempio i sinistri stradali. Nella diagnosi di intossicazione acuta letale, il laboratorio di tossicologia forense svolge un ruolo d'ausilio al perito, consentendo la produzione di un dato analitico chimico-tossicologico non equivoco e difendibile in sede giudiziaria. In tale ambito, a differenza delle analisi effettuate a scopo clinico-forense su vivente, si pongono peculiari problematiche pre-analitiche, analitiche e interpretative. A titolo esemplificativo, alcune di queste sono elencate nella Tabella 2. Il superamento delle problematiche citate avviene grazie alle specifiche dotazioni strumentali del laboratorio di tossicologia forense e alle specifiche competenze del personale. Le indagini tossicologico-forensi in tale ambito possono essere generiche, ovvero effettuate senza una preliminare indicazione delle classi di composti da indagare, oppure, più di frequente, mirate alla ricerca di uno xenobiotico specifico o di una o più classi di xenobiotici nelle matrici cadaveriche

(sangue, urina, contenuto gastrico, bile, tessuto epatico). Questa selezione preliminare condiziona poi il procedere delle metodiche analitiche successive (sia nella fase estrattiva che nella fase analitica vera e propria), essendo sempre l'indagine mirata o per classi preferibile in quanto più sensibile e affidabile.

Il laboratorio di tossicologia forense nell'analisi degli xenobiotici riveste un rilievo particolare e cruciale per le implicazioni medico-legali che conseguono ai risultati che questo produce. Tale considerazione, ovviamente, comporta una precisa responsabilità professionale da parte degli operatori. Si consideri come i risultati analitici degli accertamenti in ambito tossicologico-forense assumono carattere di prova giudiziaria, pertanto devono essere affidabili e difendibili di fronte alle contestazioni delle parti in giudizio. Da tali considerazioni emerge la necessità di un'impostazione metodologica differente da quella che sottende la diagnostica chimico-clinica, orientata generalmente a patologie nelle quali l'interesse giudiziario è in partenza escluso. Il laboratorio deve, quindi, possedere dotazioni strumentali e caratteristiche logistico-organizzative peculiari e rispondere a requisiti di qualità particolarmente stringenti. La gestione di un laboratorio con le predette prerogative necessita di personale specificamente formato e qualificato, dello sviluppo di processi e di sistemi gestionali e di controllo specifici per la tossicologia forense. In questo contesto vanno intese anche le "good laboratory practices" da adottarsi, che devono rispondere a requisiti spesso differenti da

Tabella 2*Alcune problematiche peculiari della tossicologia forense su cadavere*

Problematica	Possibili cause
Modificazioni <i>post mortem</i> della concentrazione dei composti nei fluidi e nei tessuti biologici	Diffusione post-mortale Neosintesi microbica di alcuni composti Possibile diluizione di fluidi corporei (ad es., soggetti deceduti in acqua)
Prelievi inadeguati per quantità e modalità di prelievo	Campionamenti effettuati dopo un lungo intervallo dal decesso Contaminazione esterna Quantità inadeguata per l'esecuzione di successive verifiche da parte di terze parti
Conservazione dei campioni	Instabilità dell'analita e dei suoi metaboliti per conservazioni inadeguate
Interpretazione	Scarse informazioni sul significato tossicologico delle concentrazioni misurate in sede post-mortale, tenendo conto della difformità delle situazioni in cui i decessi si sono verificati e della differente attività farmacologica dei composti originali rispetto al loro metaboliti

quelli del laboratorio clinico.

In ambito di diagnostica tossicologico-forense esistono numerose linee guida, nazionali e internazionali, la cui applicazione è alla base della difendibilità dei risultati sperimentali. È compito di ogni laboratorio scegliere la più adatta, secondo le peculiari esigenze analitiche e il quadro giuridico e/o normativo in cui opera. A livello internazionale, le principali raccomandazioni sono rappresentate dalle "Linee guida del laboratorio di tossicologia forense" proposte dalla "Society of Forensic Toxicology" (SOFT) e dalla sezione di tossicologia dell' "American Academy of Forensic Sciences" (AAFS) (1), nonché dalla "The International Association of Forensic Toxicologists" (TIAFT) (2). Non si possono comunque dimenticare, anche se meno stringenti essendo indirizzate ai laboratori di tutti i Paesi, inclusi quelli emergenti, le linee guida elaborate dall'"United Nations Office on Drugs and Crime" (UNODC) concernenti sia le indagini su materiale biologico che non (3-8).

In Italia il maggiore contributo è fornito dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI) della Società Italiana di Medicina Legale. Le "Linee guida per i laboratori di analisi di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali" fanno riferimento al corretto approccio analitico-gestionale di ogni processo in vari ambiti con specifica attenzione alle procedure relative alla determinazione dell'alcolemia e delle sostanze d'abuso (9). Un'attività di razionalizzazione e standardizzazione delle procedure relative alla ricerca delle sostanze di abuso nelle matrici biologiche è stata anche svolta dall'Istituto Superiore di Sanità (10-12).

L'ITER PROCEDURALE A FINALITÀ TOSSICOLOGICO-FORENSE

Sebbene l'approccio metodologico presenti differenze a seconda della finalità dell'accertamento, in generale è possibile identificare le seguenti fasi comuni:

- raccolta del campione, attivazione della catena di custodia, conservazione;
- fase pre-analitica, consistente nella preparazione

del campione biologico;

- fase analitica con ricerca, identificazione e quantificazione dell'analita;
- fase post-analitica o interpretativa con produzione del referto analitico.

Fase preanalitica

La corretta procedura di raccolta del campione necessita di procedimenti precauzionali, quali l'identificazione del soggetto e l'acquisizione del consenso (quando richiesto) alla procedura da parte dello stesso, nel rispetto della riservatezza personale. A garanzia dell'originalità del prelievo può essere richiesta la firma dell'interessato e/o un documento testimoniale che la attesti. La corretta esecuzione del prelievo è fondamentale poiché costituisce una insostituibile premessa all'indagine analitica anche perché risulta spesso irripetibile. Esempi della non ripetibilità sono i prelievi ematici effettuati per la valutazione dell'alcolemia in ambito di sinistri stradali o più in generale i prelievi di matrici cadaveriche.

Circa la modalità del prelievo, si richiede l'aderenza ad alcune precauzioni tecniche, come ad esempio, nell'esecuzione del prelievo ematico allo scopo di determinare l'alcolemia, l'utilizzo obbligato di disinfettanti non alcolici. In relazione alla finalità dell'indagine, è necessario operare una scelta razionale per quanto riguarda la raccolta di una o più matrici biologiche idonee allo scopo, differendo le stesse per finestra temporale di rilevazione degli analiti e per capacità di fornire informazioni utili a dirimere i quesiti (come, ad esempio, la correlazione tra composti rilevati e loro effetto biologico). Ciascun esame di liquidi biologici (sangue o urina) o matrici alternative (capelli, saliva, sudore) fornisce elementi utili per una corretta diagnosi medico-legale in specifici ambiti, ma non in altri; pertanto, la raccolta di un campione non indicato allo scopo è in grado di vanificare tutto il lavoro analitico.

La matrice di elezione nella valutazione di un uso acuto/attuale di sostanze è certamente il sangue, perché è il fluido a più diretto contatto con le strutture

effettrici. In questo senso, in linea generale si può dunque considerare che le concentrazioni di un principio attivo in questo fluido siano correlate all'effetto biologico. Sempre in termini generali, il periodo di rilevabilità si estende a poche ore antecedenti il prelievo ematico. Lo stesso è considerato in generale una procedura invasiva (anche se recentemente questa assunzione è stata criticata) e pertanto necessita dell'acquisizione del consenso informato da parte del soggetto. Il sangue prelevato è in generale addizionato di conservanti e, se necessario, di anticoagulanti. L'uso di gel separatori, pur accettato, necessiterebbe di una verifica preliminare dell'assenza di interferenze sulle procedure analitiche specifiche.

La saliva rappresenta una matrice alternativa al sangue, ma il suo utilizzo appare ancora molto limitato, in quanto la concentrazione dei composti in questo materiale presenta una relazione assai complessa con quella nel sangue. In considerazione di ciò, un risultato analitico su matrice salivare, per avere valenza tossicologico-forense, deve essere confermato su campioni ematici.

L'urina è considerata la matrice di elezione per il rilievo di uno stato di assunzione cronico, fornendo la possibilità di determinare le sostanze e i suoi metaboliti a distanza di giorni dall'assunzione. Data l'ovvia possibilità di contraffazione del campione, la raccolta del campione deve essere controllata visivamente da personale del laboratorio.

Negli ultimi due decenni si è affermato l'impiego dei tessuti cheratinizzati (capelli, altri peli, unghie) per valutare un precedente uso di sostanze. Grazie a una velocità di crescita piuttosto standardizzata e all'assenza di metabolismo in questi tessuti, a seconda della lunghezza del campione prelevato, questo approccio permette di valutare una finestra temporale di mesi/anni antecedenti il prelievo. Le analisi su sezioni seriate di capelli, che hanno una velocità di crescita nota e relativamente omogenea di ~1 cm/mese, permettono di ottenere elementi utili alla stima del periodo di assunzione. Comunque gli analiti nel tessuto cheratinizzato, esposti all'ambiente, possono in alcune circostanze deteriorarsi e interferire con la successiva interpretazione del risultato. Per tale motivo è raccomandato l'utilizzo dei segmenti più prossimali, che presentano una minima degradazione rispetto ai distali e forniscono una sensibilità diagnostica maggiore.

Si riportano nelle Tabelle 3 e 4 le informazioni riguardanti le modalità di raccolta del campione biologico e il loro impiego in tossicologia forense del vivente e i volumi e le quantità minime consigliate per la determinazione delle sostanze d'abuso e di alcol nelle principali matrici biologiche (9).

Dopo il prelievo, soprattutto se eseguito con finalità forense o amministrativa, il campione deve essere tracciabile sino al completamento dell'analisi tossicologica ed eventualmente fino alla conservazione del campione (catena di custodia). La catena di custodia rappresenta un iter procedurale fondamentale e obbligatorio per il laboratorio di tossicologia forense,

permettendo di garantire l'autenticità, l'integrità e la tracciabilità del campione, mediante la documentazione di ogni passaggio a cui il campione è sottoposto in tutto il suo percorso. Essa riguarda quindi l'identificazione, la raccolta e la tracciabilità del campione, la compilazione e la conservazione dei documenti comprovanti l'accesso e lo stoccaggio del campione e delle aliquote idonee alla ripetizione dell'analisi da parte di laboratori terzi. Nel caso di errori o omissioni nella catena di custodia, il campione non correttamente identificato o con carenze documentali non dovrebbe essere accettato dal laboratorio, che dovrà immediatamente richiedere la ripetizione della raccolta.

La conservazione di tutti i campioni deperibili (sangue/urina o frammenti di tessuto) deve avvenire in condizioni adeguate e con garanzia di non contraffazione per il tempo necessario dal prelievo fino all'analisi. E' buona pratica, e in sostanza obbligatorio per campioni risultati positivi per un determinato composto, che parte del campione sia conservata adeguatamente per ulteriori analisi (le cosiddette "controanalisi"). È suggerita una conservazione a una temperatura di +4 °C per tempi brevi oppure a -18/-24 °C per periodi più protratti. In caso di molecole labili o di necessità di conservazione per tempi indefiniti, si consiglia la temperatura di -80 °C.

La preparazione del campione si propone di rimuovere la maggior parte delle molecole che potrebbero interferire con l'analita ricercato e spesso di concentrare l'analita al fine di facilitarne la determinazione. In generale, la preparazione può avvenire mediante semplice diluizione o con tecniche che prevedono la rimozione dell'analita dalla matrice sfruttando le sue caratteristiche chimico-fisiche (ad es., punto di ebollizione, dimensioni molecolari, carica elettrica, lipofilia) o immunologiche (immuno-estrazione). Un'adeguata estrazione aumenta la selettività globale del sistema e pertanto la sua accuratezza e robustezza analitica. Tuttavia, tecnologie in genere poco sensibili alle interferenze, come i saggi immunometrici e alcuni sistemi di spettrometria di massa, possono consentire l'analisi diretta del campione, pur presentando comunque rischi di errori analitici, soprattutto in termini quantitativi.

La preparazione del campione di matrice cheratinica necessita di una fase ulteriore di decontaminazione esterna mediante lavaggio con solventi al fine di rimuovere un'eventuale contaminazione superficiale.

Fase analitica

Come affermato più sopra, il laboratorio di tossicologia forense si occupa del rilevamento, dell'identificazione e della quantificazione individuale di xenobiotici o loro metaboliti, o di classi di sostanze, in materiale biologico e non. Nei decenni recenti, e soprattutto nell'analisi routinaria delle sostanze d'abuso nei campioni biologici, è invalso l'uso di procedere in due fasi, una prima di screening e di una successiva di conferma (13). La prima consente di rilevare

Tabella 3

Indicazioni tecniche riguardanti la raccolta del campione nel vivente, le opportunità analitico/interpretative correlate, nonché le opportune modalità di prelievo

Matrice biologica	Periodo di rilevabilità	Modalità
Sangue	Inizio: subito dopo l'iniezione o l'inalazione; parecchi minuti dopo l'assunzione orale Termine: variabile in base ai parametri di tossico-cinetica (emivita) È utile a rilevare uno stato di intossicazione al momento del prelievo o in tempi di poco anteriori	Prelievo sangue venoso Evitare disinfettanti alcolici in caso di prelievo per alcolemia Trattasi di manovra invasiva
Saliva	Analogo al sangue	Normali provette di plastica con chiusura ermetica o kit di raccolta per la saliva provvisti di contenitori specifici (alcuni dei quali favoriscono anche la produzione della saliva insieme alla sua raccolta) Trattasi di manovra non invasiva, ma che comunque richiede la collaborazione del soggetto
Urina	Inizio: dipende dalla funzione renale (in genere, decine di minuti) Termine: variabile sulla base del metabolismo e idrofilia dei composti/prodotti (emivita di eliminazione) È utile a rilevare assunzione pregressa di composti, con una finestra cronologica di 1-3 giorni (a eccezione di composti dotati di elevata affinità per i tessuti periferici ed elevato volume di distribuzione)	Trattasi di manovra non invasiva, ma intrusiva nella riservatezza personale Per garantire l'autenticità del campione, la raccolta deve essere effettuata sotto controllo di un operatore sanitario
Tessuto pilifero	Inizio: nei segmenti prossimali la rivelabilità inizia pochi giorni dopo l'assunzione Termine: dopo mesi/anni; dipende strettamente dalla lunghezza del campione e dal ciclo di crescita della struttura pilifera È utile a rilevare uno stato di intossicazione pregressa, prevalentemente cronica o ripetuta La presenza di xenobiotici nel tessuto pilifero risente anche di una possibile contaminazione ambientale	Ciocca di capelli o peli pubici di lunghezza nota, prelevati dalla base

Tabella 4

Volumi e quantità minime consigliate per la determinazione di sostanze d'abuso e di alcol

Matrice biologica	Volume/quantità
Sangue	6-10 mL ^a
Saliva	2 mL
Urina	30 mL
Matrice pilifera	80 mg

^a6 mL di sangue sono sufficienti per la sola determinazione alcolemica; 10 mL sono sufficienti per la determinazione delle principali sostanze d'abuso.

qualitativamente la presenza o l'assenza di sostanze o classi di sostanze nei campioni biologici, minimizzando i falsi negativi con elevata produttività e bassi costi. La seconda, generalmente applicata su campioni presuntivamente positivi allo screening, si propone di identificare ed escludere i falsi positivi, mediante l'impiego di tecniche più sofisticate e specifiche, ma necessariamente più costose, attualmente basate sulla spettrometria di massa. L'impiego in sequenza delle due fasi descritte consente teoricamente la produzione di risultati altamente affidabili, minimizzando i costi

complessivi e massimizzando la produttività.

Le analisi di screening, basate generalmente su saggi immunometrici consentono di valutare la presenza o l'assenza di composti o loro metaboliti in maniera rapida, permettendo l'analisi di un gran numero di campioni, in elevata o totale automazione e senza necessità di personale specializzato. In realtà, queste tecniche sono solitamente qualitative o semi-quantitative, essendo basate sull'affinità di anticorpi verso antigeni multipli (classi di composti simili e loro metaboliti), che necessariamente varia da composto a composto. Si caratterizzano, pertanto, per una bassa specificità e quindi per una modesta accuratezza del risultato quantitativo. Metodi di screening tipici sono rappresentati da metodi EIA, RIA, metodi immunometrici in fluorescenza a luce polarizzata (FPIA) e per interazione cinetica di microparticelle in soluzione (KIMS). Ovviamente, queste tipologie di indagini richiedono lo sviluppo di specifici anticorpi per ogni classe di sostanze e necessitano di investimenti ritenuti dai produttori convenienti solo per i composti tossici più diffusi. Pertanto l'analisi di composti nuovi o a limitata diffusione non può essere condotta con queste tecnologie.

In sostanza, nessuna tecnica di screening è in grado

da sola di rispondere al quesito tossicologico forense. Tali tecniche forniscono soltanto un risultato di tipo presuntivo, vale a dire di probabile negatività o positività (definita anche “non negatività”) del campione rispetto alla presenza di un analita o più spesso di più specie chimiche, relativamente a un valore soglia prestabilito. Un limite di concentrazione significativa (identificato come valore soglia) è spesso impiegato in maniera convenzionale per stabilire la negatività o la positività del campione rispetto a un determinato analita. Questo approccio, largamente adottato soprattutto nei laboratori clinici, espone tuttavia alla possibilità di gravi errori. Infatti, il termine stesso di valore soglia e il suo uso pratico rappresentano una origine potenziale di equivoci. Il valore soglia può essere inteso come la concentrazione minima determinabile con affidabilità (valore soglia analitico) oppure come la concentrazione più elevata alla quale non si riconosce una valenza in ambito interpretativo (valore soglia interpretativo). Mentre il primo è caratteristico del metodo utilizzato, il secondo può variare a seconda degli ambiti applicativi dell’analisi; una sua applicazione non corretta può comportare gravi errori anche in ambiti estremamente delicati come l’affidamento dei minori o l’idoneità all’uso di strumenti pericolosi (inclusi gli autoveicoli). La scelta dei valori soglia deve essere quindi eseguita con riferimento a quanto comunemente accettato e suggerito in ambito scientifico internazionale.

Le metodiche di conferma si basano generalmente su metodi chimico-fisici ibridi costituiti da sistemi gas cromatografici o di cromatografia liquida a elevata efficienza accoppiati a spettrometri di massa operanti per frammentazione e/o in alta risoluzione. Le tecniche tradizionalmente utilizzate impiegano la gas cromatografia capillare accoppiata alla spettrometria di massa secondo lo schema del singolo quadrupolo (GC-MS) o più modernamente del triplo quadrupolo (GC-MS/MS). Più recentemente, si è ampiamente estesa l’applicazione HPLC oppure la forma di cromatografia liquida denominata “ultra high performance liquid chromatography” (UHPLC) accoppiata alla spettrometria di massa nello schema del triplo quadrupolo (QqQ MS) o della trappola ionica (ion trap MS). Alla cromatografia liquida e, più raramente, alla

gas cromatografia sono accoppiabili anche sistemi di spettrometria di massa ad alta risoluzione, quali spettrometri a tempo di volo (TOF) o operanti secondo lo schema Orbitrap. In linea generale, in GC-MS sono analizzate sostanze volatili e termoresistenti, mentre in cromatografia liquida (LC-MS) vengono più facilmente analizzate molecole idrosolubili e termolabili. Grazie anche all’introduzione di librerie spettrali, anche ad alta risoluzione, è possibile soddisfare le esigenze della cosiddetta “systematic toxicological analysis” (STA), vale a dire la ricerca non mirata, generica di composti tossici nel campione.

Fase interpretativa

La fase interpretativa rappresenta l’ultima operazione dell’iter tossicologico-forense e trova fondamento nell’epicrisi medico-legale e tossicologico-forense dei dati disponibili. L’interpretazione di un dato analitico, riassunta nella Figura 1, è un’attività multidisciplinare che implica la comparata disamina di dati di tipo:

- anamnestico e circostanziale, che possono fornire informazioni relative a epoca e modalità di assunzione, ivi comprese via di somministrazione, singola o reiterata nel tempo, tipologia di xenobiotico, concentrazione di principio attivo nella formulazione, eventuale assunzione in concomitanza di altri xenobiotici che ne potenzino l’azione in maniera additiva o moltiplicativa, con meccanismo interattivo di tipo tossico-cinetico e/o tossico-dinamico;
- clinico, utili a stabilire i tempi e i modi con i quali la sintomatologia si è manifestata;
- anatomo-patologico, per il rilievo diretto di danni d’organo e, unitamente ai dati anamnestici (vale a dire notizie cliniche relative a eventuali patologie e condizioni patologiche preesistenti e tossico-genetici (ovvero informazioni inerenti la variabilità genetica inter-individuale nella risposta farmacocinetica e farmacodinamica agli xenobiotici), utili a stabilire la sussistenza di eventuali patologie/condizioni preesistenti idonee a potenziare gli effetti tossici in termini farmacocinetici (incremento delle concentrazioni tossiche a livello

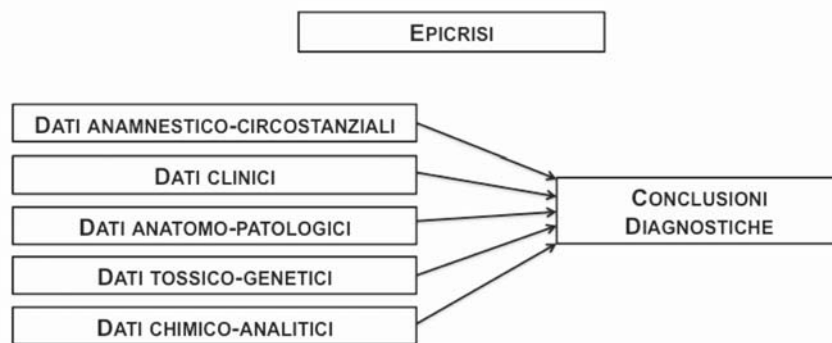


Figura 1
Fase interpretativa dell’iter tossicologico-forense.

- degli organi bersaglio) o farmacodinamici (alterazioni recettoriali/riduzione della riserva funzionale degli organi bersaglio);
- chimico-analitico, vale a dire identificazione qualitativa e determinazione quantitativa dei composti di interesse nei campioni analizzati, tenendo conto degli eventuali limiti in termini di sensibilità e specificità della tecnica analitica utilizzata, nonché le peculiari caratteristiche della matrice biologica esaminata relative, in particolare, ai tempi e alle modalità con le quali lo xenobiotico oggetto di studio e/o i suoi metaboliti vengono incorporati e rimangono rilevabili.

Un'appropriate interpretazione del dato non può infine prescindere dall'ambito in cui si opera. Sono ad esempio applicati criteri diagnostici differenti nell'identificazione di un uso/abuso di sostanze stupefacenti in ambito clinico rispetto agli ambiti della sicurezza sul lavoro, sulla strada o dell'affidamento di minorenni. Nella fase interpretativa si deve ovviamente tenere in considerazione non solo la presenza e la concentrazione dei principi attivi nei campioni, ma anche la significatività delle matrici analizzate ai fini della diagnosi dell'intossicazione.

A titolo di esempio delle molteplici difficoltà interpretative, presentiamo in sintesi le problematiche poste dalle norme sulla sicurezza alla guida come previste dal vigente Codice della Strada e dalle leggi e direttive collegate. L'approccio adottato nella legislazione italiana presenta un doppio binario: da un lato è vietata la guida in stato di ebbrezza alcolica (art. 186 C.d.S.) e in stato di alterazione psico-fisica per uso di sostanze stupefacenti o psicotrope (art. 187 C.d.S.); dall'altro lato è vietata la concessione o il rinnovo della patente di guida ai soggetti che presentino uno stato di dipendenza attuale da alcool o da sostanze stupefacenti/psicotrope o comunque, in caso di dipendenza pregressa, un significativo rischio di recidiva (art. 320, app. II del Regolamento di esecuzione e di attuazione del nuovo Codice della Strada, aggiornato alle più recenti modificazioni) (14). In sostanza, nella prima ipotesi si deve provare che, al momento del sinistro o dell'accertamento di polizia, il guidatore era sotto l'effetto di alcol o sostanze stupefacenti. Pertanto, l'analisi deve fornire informazioni sulla condizione del soggetto di poco antecedente il prelievo (indagine retrospettiva). Nella seconda ipotesi invece il dato analitico dovrà supportare un giudizio medico di idoneità alla patente di guida, provando che il soggetto non presenta elementi indicativi di un rischio incrementato di provocare incidenti in futuro rispetto alla popolazione generale (giudizio prospettico). Pertanto, nel primo caso l'indagine tossicologica dovrà mirare alla determinazione nel sangue dei composti psicotropi e dei loro metaboliti in forma farmacologicamente attiva, essendo poco rilevanti quei metaboliti (come ad es., i glucuronidi) che non presentano un'importante attività biologica, pur essendo correlati a un pregresso uso di sostanza psicoattiva. L'assenza nel sangue del composto attivo, pur in presenza di metaboliti inattivi,

esclude dunque l'applicabilità delle sanzioni ex art. 187 (o 186), ma comunque identifica un pregresso uso e pertanto il conducente, pur escluso dalla sanzione penale, sarà non idoneo alla patente di guida.

CONCLUSIONI

L'analitica tossicologico-forense ha oggi un ruolo fondamentale nelle giurisdizioni dei Paesi progrediti e sta assumendo un'importanza non dissimile anche nei Paesi in via di sviluppo, come testimoniato dai programmi di verifica della qualità sviluppati e distribuiti internazionalmente dall'UNODC. Le competenze tecnologiche e intellettuali che questa analitica richiede sono tuttavia piuttosto particolari e devono essere formate e coltivate in forma non occasionale. Certamente una competenza nella produzione e nella gestione di dati chimico-clinici ed ematologici non è sufficiente per la gestione di una sezione del laboratorio che abbia una specifica missione nel settore tossicologico-forense. Esistono associazioni a livello internazionale (come le già citate TIAFT, SOFT) e anche nazionale (GTFI) che possono assistere i professionisti interessati nella creazione di un bagaglio culturale adeguato. Vale la pena anche ricordare come, particolarmente in ambito forense dove le conseguenze di un errore analitico o di un'interpretazione errata del dato possono avere ripercussioni giuridiche e sociali dirette sul soggetto interessato dalle indagini, l'attività professionale comporti anche una responsabilità penale e civile dell'operatore, che pertanto deve munirsi delle salvaguardie culturali e assicurative che lo tutelino in questa attività così antica ma che solo recentemente ha avuto una diffusione capillare nella società.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. SOFT/AAFS. Forensic toxicology laboratory guidelines. http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf
2. TIAFT – The International Association of Forensic Toxicologists Committee of Systematic Toxicological Analysis. Laboratory Guidelines. <http://www.tiaft.org/data/uploads/documents/tiaft-sta-laboratory-guidelines.pdf>
3. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens: manual for use by national laboratories. http://www.unodc.org/pdf/publications/report_assay_1995-09-01_1.pdf
4. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid: manual for use by national drug analysis laboratories. https://www.unodc.org/documents/scientific/ST_NAR_30_Rev.3_Hair_Sweat_and_Oral_Fluid.pdf
5. Recommended methods for the identification and analysis of cocaine in seized materials. https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf
6. Recommended methods for the identification and analysis

- of cannabis and cannabis products. <http://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook.pdf>
7. Recommended methods for the identification and analysis of amphetamine, methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials. <https://www.unodc.org/pdf/scientific/stnar34.pdf>
 8. Recommended methods for the identification and analysis of barbiturates and benzodiazepines under international control. https://www.unodc.org/documents/scientific/barbiturates_and_benzodiazepines.pdf
 9. Gruppo Tossicologi Forensi Italiani. Linee guida per i laboratori di analisi di sostanze di abuso con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. Revisione n. 3 del 01.03.2010. http://tossicologia-forense.unina2.it/dwn/LINEEGUIDA%20-%20REV.3_2010.pdf
 10. Pichini S, Pacifici R. Linee guida per la determinazione delle sostanze di abuso nelle urine. http://www.iss.it/binary/ofad4/cont/Linee_Guida_Urine_xweb.pdf
 11. Pichini S, Pacifici R. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella matrice pilifera. http://www.iss.it/binary/ofad4/cont/Linee_Guida_Capelli_xweb.pdf
 12. S. Pichini, R. Pacifici. Linee guida per la determinazione delle sostanze d'abuso nella saliva. http://www.iss.it/binary/drog4/cont/Linee_Guida_Saliva_xweb.pdf
 13. Bertol E. *Analitica tossicologica: aspetti tecnici interpretativi, giuridici e deontologici*. Bologna: Società Editrice Esculapio, 2011.
 14. Decreto del Presidente della Repubblica 16 dicembre 1992, n. 495 (in Suppl. ord. alla Gazz. Uff., 28 dicembre 1992 n.303, con le modifiche di cui al D.P.R. 16 settembre 1996, n. 610).

Appropriatezza della richiesta di esami ed esiti clinici: il caso delle malattie renali, tiroidee e della celiachia

Mario Plebani¹, Renato Tozzoli², Tommaso Trenti³, Ferruccio Ceriotti⁴, Francesca Di Serio⁵

¹Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Maria degli Angeli, Pordenone

³Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria e Azienda USL, Modena

⁴Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁵Patologia Clinica Ospedaliera, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico, Bari

ABSTRACT

Appropriateness of test request and clinical outcome: the example of kidney, thyroid and coeliac disease. This document analyzes the topic of appropriateness of test request. It is organized in 4 parts. The first deals with the theme of appropriateness, the consequences of insufficient or excessive test request and the need to balance guideline indications with the clinical need of a single patient. The other 3 parts present the cases of thyroid, chronic kidney and coeliac disease. With regard to the thyroid function, population screening, excluding neonates, is not recommended; on the contrary, it is highly recommended to evaluate the thyroid function in any individual with even only a minimal clinical suspect. The thyrotropin (TSH) is the test of choice with reflex free T4 and free T3, according to specific algorithms. The contemporaneous measurement of free FT3, free FT4 and TSH, except for specific cases, should be discouraged due to the high frequency of unjustified abnormal findings. Anti-thyroperoxidase antibodies are the test of choice for autoimmune thyroid diseases. In chronic kidney disease (CKD), the estimated glomerular filtration rate (eGFR) based on serum creatinine in most cases is the best indicator of renal function, provided that creatinine is measured with the accurate enzymatic method. In borderline situations, a confirmatory eGFR calculation based on cystatin C is recommended. Urinary albumin, expressed as albumin/creatinine ratio, is an essential complement for CKD staging. The diagnosis of coeliac disease requires integration between clinical, histological and serological data. The anti-transglutaminase IgA is the test of choice; only when an IgA deficit is present, the test to be used is IgG anti-gliadin deamidate peptides. The genetic HLA DQ2/DQ8 test is indicated for screening of subjects at risk: if negative, coeliac disease can be excluded.

PREMESSA

Il presente documento ha lo scopo di analizzare il problema dell'appropriatezza della richiesta di esami di laboratorio, argomento complesso e dibattuto dal punto di vista professionale, gestionale ed economico. L'analisi e le proposte rappresentano un primo contributo di un gruppo di professionisti di Medicina di Laboratorio, chiamati da Siemens Healthcare Italia a operare, in collaborazione con il Centro di Ricerche sulla Gestione dell'Assistenza Sanitaria e Sociale (CERGAS) dell'Università Bocconi di Milano, su tematiche di "management" sanitario. L'articolo è strutturato in 4 parti: la prima relativa ad aspetti generali di governo clinico, la seconda riferita al caso degli esami di funzionalità tiroidea (TFT), la terza relativa alle modalità dello

screening della malattia renale cronica (CKD), la quarta riferita alla diagnosi della malattia celiaca.

L'APPROPRIATEZZA IN MEDICINA DI LABORATORIO

Vi è crescente interesse e dibattito sul tema dell'appropriatezza in medicina, fondamentale per la preoccupazione derivante dall'aumento dei costi e per le problematiche di accessibilità, equità, sostenibilità e sicurezza per la diagnosi e cura in tutti i sistemi sanitari (1, 2). In Medicina di Laboratorio la ricerca di un equilibrio ottimale tra necessità di razionalizzazione senza razionamento è problema quotidiano: il tema dell'inappropriatezza nella richiesta degli esami è legato

Corrispondenza a: Ferruccio Ceriotti, Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Francesco Sforza 28, 20122 Milano. Tel. 0255032876, Fax 0255032876, E-mail ferruccio.ceriotti@policlinico.mi.it

Ricevuto: 22.05.2017

Revisionato: 30.06.2017

Accettato: 04.07.2017

Publicato on-line: 03.08.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.040

al costo crescente delle indagini di laboratorio e ai costi indiretti che possono derivare dall'informazione di laboratorio in termini di ricadute e ulteriori indagini diagnostiche, ricoveri e trattamenti terapeutici (3). In quest'ultimo caso, si parla di "sindrome di Ulisse" a raffigurare come i pazienti possano perdersi in peregrinazioni sanitarie generate da domande sbagliate derivanti da precedenti risposte errate (4).

A fronte di una generale e generica enfasi sull'inappropriatezza nella richiesta di esami di laboratorio, deve peraltro essere sottolineato che i dati della letteratura nel quindicennio 1997-2012 documentano che la sottoutilizzazione è prevalente rispetto alla sovrautilizzazione (all'incirca, 45% vs. 20%) (5). Inoltre, si evidenzia il numero relativamente modesto di studi sul tema dell'appropriatezza e i difetti nel loro disegno legati anche allo scarso consenso sulla definizione stessa del termine. Il "College of American Pathologists" negli "Standards for Accreditation" ha definito l'appropriatezza come "il grado con il quale una procedura, un trattamento, un esame o il servizio di laboratorio è efficace, chiaramente indicato, non eccessivo, adeguato in quantità, e fornito in regime di ospedalizzazione, ambulatoriale e in altri contesti clinici per rispondere ai bisogni del paziente" (6). In effetti, anche la definizione generica di appropriatezza in medicina che fa riferimento alle prove che la procedura generi un beneficio per la salute superiore di un margine adeguato al rischio per il paziente, anche in termini psicologici e di costi, ribadisce l'esigenza di una visione centrata sui bisogni clinici.

Più recentemente, il tema dell'appropriatezza in Medicina di Laboratorio è stato ricondotto all'interno del concetto del "demand management", ossia della gestione dell'appropriatezza della richiesta non solo per evitare sprechi, uso incongruo delle risorse e aumento ingiustificato dei costi, ma per migliorare la qualità e la sicurezza per i pazienti (7-9). È infatti dimostrato che una richiesta eccessiva e non correlata al reale quesito clinico determina un aumento dei falsi positivi per effetto della ridotta prevalenza della malattia e quindi della bassa probabilità a priori che incide fortemente sull'accuratezza diagnostica (valore predittivo) dell'esame (10-12).

Pertanto, se è vero che si definisce inappropriata una richiesta di esami che sia al di fuori di ogni forma di guida accettata (linea guida, raccomandazione, suggerimento di esperti), è altrettanto chiaro che l'appropriatezza va misurata rispetto ai reali bisogni del paziente e nello specifico contesto clinico. Inoltre, il tema dell'appropriatezza non deve limitarsi alla sola fase della richiesta, ma si deve estendere a tutte le fasi del ciclo dell'esame di laboratorio per evitare inappropriate modalità di prelievo, manipolazione, trasporto dei campioni biologici e ancora inappropriate modalità analitiche e post-analitiche.

Scopo di questo articolo è identificare alcune situazioni paradigmatiche all'interno delle quali sia possibile studiare e identificare i bisogni clinici del paziente e, su questa base razionale, creare le

opportunità per migliorare l'appropriatezza nella richiesta di esami di laboratorio. Si ritiene, in particolare, che nell'ambito della diagnostica della funzionalità tiroidea, delle malattie renali e della malattia celiaca esistano prove di letteratura ed esperienze idonee a portare a termine il percorso per una "governance" clinica della domanda di esami diagnostici efficiente ed efficace.

La crescita dei carichi di lavoro e delle attività diagnostiche nel laboratorio clinico

Vi è indubbiamente un costante incremento nella richiesta di esami di laboratorio, anche se è difficile identificare dati che riassumano esplicitamente i "pattern" di richiesta degli esami diagnostici sia in ambito nazionale che internazionale. Nell'ultimo decennio vi è stato un aumento non solo nel Regno Unito, ma anche negli Stati Uniti, in Canada e in tanti altri paesi, tra cui l'Italia. L'aumento osservato nella richiesta di esami di laboratorio è particolarmente evidente nelle richieste provenienti dalla medicina di base, con incrementi annuali a due cifre. Vi sono molte ragioni che spiegano e giustificano questo incremento, quali:

- a) il passaggio da una medicina curativa a una medicina preventiva e personalizzata che ricerca l'identificazione dei fattori di rischio, la diagnosi precoce e terapie sempre più mirate grazie all'utilizzo dell'informazione di laboratorio;
- b) l'espansione della gamma degli esami disponibili, con possibilità di pannelli "multimarker" a impatto decisionale rilevante, come nella gestione dell'infarto miocardico acuto (13);
- c) la curiosità e l'interesse verso nuove tecnologie ed esami diagnostici fortemente propagandati come innovativi;
- d) un approccio passivo a recepire acriticamente iniziali risultati di ricerche, nonostante l'incompletezza e la parzialità dei dati scientifici;
- e) l'impulso sociologico e culturale a ritenere che lo screening in condizioni di basso rischio di patologia, come nel caso di "check-up" in soggetti sani, sia di valore importante (14);
- f) la crescita delle aspettative, sia nei medici che nei pazienti, nel potere diagnostico degli esami di laboratorio (15);
- g) l'uso di profili di esami per cercare di ridurre i tempi del processo clinico-diagnostico;
- h) la rassicurazione del paziente mediante esami diagnostici in sostituzione del rapporto personale medico-paziente, con l'unico effetto di diminuire le successive visite al medico di famiglia e di produrre peraltro rischi relativi alla non corretta valutazione clinica (16, 17);
- i) le modalità di finanziamento presenti in alcuni sistemi sanitari, in cui il numero di esami richiesti determina l'incremento dei profitti dell'istituzione sanitaria con conseguente incentivo a proporre sempre di più, fenomeno storicamente presente negli Stati Uniti o in ambiti sanitari fortemente orientati a modelli privatistici di sanità;

- j) invecchiamento della popolazione, con conseguente aumento della prevalenza di malattie croniche;
- k) protocolli e linee guida sviluppate e utilizzate con elenchi di esami applicati genericamente a tutti i pazienti (18);
- l) timore di contestazioni e medicina difensiva;
- m) esami in sequenza indotti da dati anomali; statisticamente molti esami sono caratterizzati (specialmente nei risultati indiretti dei test multipli di screening) da un alto numero di risultati anomali in soggetti senza vere patologie. Questo fenomeno a sua volta induce la ripetizione degli esami di partenza e la richiesta di ulteriori esami e indagini diagnostiche, anche complesse (19);
- n) l'esercizio professionale in laboratori isolati dalla complessità dei percorsi diagnostici; sia i medici che operano all'interno degli ospedali, che i medici di medicina generale, se isolati dai laboratori che erogano le prestazioni diagnostiche, tendono a non essere pienamente consapevoli di quanto richiesto per mancanza di significativi "feedback".

Richieste inappropriate e sicurezza del paziente: quando un esame è rischioso per la salute

È noto come molti errori in medicina avvengono nel momento diagnostico; tuttavia, l'effettiva comprensione e gestione dell'errore di laboratorio è resa complessa dalla difficoltà di definire in modo esplicito e misurabile la relazione fra rischio e processo di erogazione/esecuzione dell'esame, ovvero di quanto avviene all'interno del laboratorio in ragione di quanto avviene o si determina all'esterno. Il modello di processo diagnostico globale proposto da Gambino già nel 1970 (20), sviluppato nel "brain to brain loop" da Lundberg nel 1981 (21), e infine più recentemente rivisto da Plebani et al. (22), evidenzia come il valore dell'informazione diagnostica sia fortemente determinato e condizionato da eventi che avvengono prima che il campione giunga in laboratorio o dopo che il risultato è rilasciato dal laboratorio stesso.

La percentuale di richieste inappropriate, intese come inutili o potenzialmente dannose, è stimata fra 5% e 95% (3, 23), dimostrando grande variabilità nelle modalità e nelle metodologie di valutazione. E' comunque evidente come l'utilizzo di esami di laboratorio non necessari produce un impatto rilevante sulle risorse a disposizione e sulle modalità del loro impiego, con un potenziale danno ai pazienti (24). Tradizionalmente, i laboratori clinici valutano le loro prestazioni basandosi su dati di efficienza e di qualità analitica interna piuttosto che sulla valutazione dei risultati ottenuti sulla salute dei pazienti. Ad esempio, il "turnaround time" (TAT) è la misura all'interno del laboratorio dal tempo di arrivo del campione al tempo di refertazione e non del completo iter del "brain to brain loop"; analogamente, le valutazioni della qualità del processo esterno sono sostanzialmente valutazioni di qualità del processo di produzione, come nel caso dei campioni con emolisi, perdita o non esecuzione di

campioni inviati, errori d'identificazione, etc.

L'approccio basato sui risultati valutati come esiti per il paziente, ovvero sugli "outcome" di salute, è alla base di una corretta politica per l'identificazione dell'errore e del rischio clinico e delle conseguenti azioni volte all'effettivo miglioramento del processo. Tuttavia, questo approccio richiede strumenti e ricerche finalizzate per misurare in modo sistematico l'impatto delle cause di errore quasi sempre complesse e di ardua individuazione. In altri termini, le prove di efficacia, pressantemente richieste nei percorsi basati sull'"evidence-based medicine" (EBM), sono difficili da ottenere. La richiesta di un esame inappropriato, per esempio, è stata sempre direttamente correlata e valorizzata in termini di costo dell'esame, nella prospettiva di ridurre il volume delle prestazioni diagnostiche e dei budget, anche se è l'esito complessivo nel percorso di cura a essere considerato come vero "end point" di una valutazione EBM (25, 26). Una risposta operativa recentemente introdotta in alcuni laboratori è di modificare il percorso diagnostico con allarmi ("warning/alert") prescrittivi al momento della richiesta o aggiunta di nuovi esami "riflessi" a seguito dei risultati di un esame iniziale, con l'obiettivo di ridurre l'esecuzione di esami potenzialmente inutili o capaci d'indurre un inaccettabile numero di falsi positivi, come nel caso della diagnostica tiroidea. E' da sottolineare come non sia possibile implementare alcuna azione quando non esistano raccomandazioni diagnostiche basate su prove robuste e rilevanti e più in generale su una cultura scientifica adeguata.

FUNZIONALITÀ TIROIDEA

Le tireopatie sono patologie estremamente diffuse nella popolazione di tutto il mondo: considerando le due forme cliniche principali di disfunzione tiroidea, la prevalenza è del 4,6-8,9% per l'ipotiroidismo (4,3-8,5% per le forme subcliniche e 0,3-0,4% per le forme conclamate) e del 1-2% per l'ipertiroidismo (0,5-1,2% per le forme subcliniche e 0,4-0,8% per le forme conclamate (27-29). L'ipotiroidismo riconosce come cause più frequenti la tiroidite cronica autoimmune, la tiroidectomia e la terapia radiometabolica per ipertiroidismo, mentre l'ipertiroidismo annovera tra le cause più comuni il morbo di Basedow-Graves, il morbo di Plummer (adenoma solitario tossico), il gozzo multinodulare e la terapia sostitutiva per ipotiroidismo.

Gli esami di laboratorio relativi alla funzione della ghiandola tiroidea sono attualmente rappresentati da tireotropina (TSH), triiodotironina, libera (FT3) e totale (TT3), tetraiodotironina o tiroxina, libera (FT4) e totale (TT4), tireoglobulina, calcitonina, iodio nelle urine, anticorpi anti-tireoglobulina (TgAb), anti-tireoperossidasi (TPOAb) e anti-recettore del TSH (TRAb).

Le condizioni cliniche prevalenti nelle quali viene attivata la richiesta di esami di funzionalità tiroidea (TFT) sono rappresentate da:

- a) screening di popolazione apparentemente sana;
- b) accertamento diagnostico su soggetto ambulatoriale

- con sintomatologia clinica ascrivibile a disfunzione tiroidea;
- c) accertamento diagnostico su paziente ospedalizzato con sintomatologia clinica ascrivibile a disfunzione tiroidea;
 - d) monitoraggio del decorso della tireopatia diagnosticata e/o della terapia specifica (medica e/o chirurgica).

A causa della mancanza di consenso tra società scientifiche sull'efficacia/opportunità dello screening di funzione tiroidea, l'opinione prevalente considera che non vi siano sufficienti prove a sostegno dell'attuazione di screening di popolazione (con l'unica eccezione dei neonati), quanto invece quelle a sostegno del "case finding" aggressivo di soggetti ad alto rischio (ad es., donne in gravidanza) (30). L'accertamento diagnostico in soggetti ambulatoriali con sospetto clinico di tireopatia va previsto in tutte le condizioni in cui siano presenti sintomi ascrivibili a disfunzione tiroidea, mentre l'accertamento diagnostico in pazienti ospedalizzati viene considerato nel caso di un paziente sintomatico per malattia tiroidea durante un ricovero ospedaliero o nel caso di una malattia non tiroidea nel corso della quale si vuole identificare una concomitante disfunzione tiroidea.

La determinazione della concentrazione plasmatica del TSH rappresenta l'esame più affidabile per la diagnosi di disfunzione tiroidea, per la valutazione della terapia sostitutiva con L-tiroxina e della terapia soppressiva (tireostatica) con anti-tiroidei (28-30). Il TSH per primo (TSH "first") o TSH da solo (TSH "alone") o TSH di prima linea ("first-line" TSH) ha una storia almeno trentennale, dato che questa strategia diagnostica è stata proposta per la prima volta a metà degli anni '80 (31). Il rationale di questa strategia si basa su due fondamentali presupposti:

- a) l'evoluzione tecnologica dei metodi immunometrici di misura del TSH di 2^a (sensibilità funzionale: 0,1-0,2 mUI/L) e, in particolare, di 3^a generazione (sensibilità funzionale: 0,01-0,02 mUI/L), introdotti nella pratica corrente da più di 20 anni (32). Questi metodi hanno consentito di distinguere le concentrazioni circolanti dell'ormone nei soggetti sani da quelli ipertiroidei;
- b) la dimostrazione della relazione logaritmica-lineare inversa tra TSH e FT4, che si estrinseca nella comparsa di rilevanti variazioni di TSH in presenza di minime variazioni di FT4; conseguentemente, il TSH presenta una maggiore sensibilità rispetto a FT4 nel dimostrare variazioni di funzione tiroidea (33), anche se questa relazione è stata recentemente dimostrata essere più complessa di quanto a lungo ritenuto, essendo dipendente dall'età e dal sesso (34).

L'introduzione dei metodi di 2^a e 3^a generazione per la determinazione del TSH ha permesso di identificare correttamente la maggior parte dei pazienti affetti da ipotiroidismo e ipertiroidismo subclinici e conclamati: un valore di TSH compreso all'interno di un intervallo di riferimento correttamente identificato consente di definire accuratamente un soggetto come eutiroidico.

Questa strategia è caldamente raccomandata da

almeno 15 anni nello screening o nel "case finding" aggressivo della funzione tiroidea (27, 29, 33, 35, 36), anche se sono note da molto tempo numerose insidie dell'impiego del TSH da solo, legate al fatto che concentrazioni anormali dell'ormone possono essere osservate in numerose condizioni non tiroidee (ad es., gravidanza, anoressia nervosa, impiego di farmaci), nelle patologie ipotalamo-ipofisarie (adenomi ipofisari, ipotiroidismo centrale, ipertiroidismo centrale, resistenza ipofisaria all'ormone tiroideo), in caso di presenza nel siero di sostanze interferenti con la misura di TSH e nella fase iniziale della terapia sostitutiva o soppressiva (30, 36-41). In assenza di queste condizioni, la misurazione del TSH da solo presenta un'accuratezza diagnostica >90% (30, 40): questa caratteristica, unita al contenimento dei costi rispetto all'associazione di più esami tiroidei, ha ormai attribuito un ruolo fondamentale alla misurazione del TSH da solo nello screening o nel "case finding".

"TSH riflesso" e algoritmo diagnostico di laboratorio

La pratica di aggiungere ulteriori esami di laboratorio alle richieste originali del clinico è ormai comune nei laboratori in molti paesi del mondo (42). Lo scopo è di escludere o confermare una diagnosi in base ai risultati dell'esame iniziale: la maggior parte degli esami ulteriori sono aggiunti direttamente dai sistemi informatici dei moderni analizzatori automatici sulla base di regole predefinite degli algoritmi diagnostici di laboratorio (esami riflessi o a cascata o a protocollo).

Assieme agli esami riflessivi (aggiunti mediante un intervento diretto del laboratorista a esercitare la sua esperienza nel governo clinico e nella consulenza clinica) (43), gli esami riflessi aggiungono valore agli esami di laboratorio e consentono di coniugare efficienza, efficacia e riduzione del tempo di risposta, quando gli analizzatori sono in grado di eseguire tutti gli esami presenti nell'algoritmo.

Con l'introduzione dei metodi di misurazione del TSH a elevata sensibilità e delle frazioni libere degli ormoni tiroidei, con l'impiego di metodi diretti ad analogo marcato, sono state progressivamente proposte strategie di analisi decisionale basate essenzialmente sull'impiego di T4 per primo (TT4 o FT4 screen) (44) o di TSH per primo (31), con l'esecuzione successiva di altri TFT (TSH e FT3 nel primo caso e FT4 e FT3 nel secondo), in base alla presenza di risultati eccedenti i limiti di riferimento, superiore (URL) e inferiore (LRL), del primo esame. L'analisi costo-beneficio ha fin dall'inizio dimostrato che entrambe le soluzioni sono economicamente più vantaggiose rispetto all'esecuzione di esami a profilo, consentendo di evitare esami inutili e, in particolare, che la seconda soluzione (solo TSH) risulta preferibile (27, 36, 37, 45, 46), anche se di costo lievemente superiore alla strategia basata su FT4 (47). Il "TSH riflesso" è quindi entrato ormai nella pratica di molti laboratori del nostro Paese. Del tutto recentemente sono stati proposti algoritmi diagnostici estesi non solo a TSH,

FT4 e FT3, ma anche agli autoanticorpi (TPOAb, TgAb, TRAb) (Figura 1) (48), grazie all'introduzione di metodi automatizzati nelle piattaforme analitiche commerciali e al sempre più riconosciuto ruolo di questi anticorpi nella diagnosi delle principali tireopatie (49, 50).

Intervallo di riferimento del TSH

Il corretto impiego del TSH riflesso presuppone la definizione del corretto intervallo di riferimento (IR) dei TFT presso i laboratori che impiegano questa procedura. Il problema dell'IR del TSH è dibattuto da molto tempo: mentre il suo LRL è considerato meno variabile e vi è consenso nel considerare un valore oscillante tra 0,2 e 0,4 mUI/L (51, 52), la definizione dell'URL è stata lungamente dibattuta, a causa della variabilità analitica tra i metodi di misura del TSH di 3^a generazione e le modalità di selezione della popolazione di riferimento. Dato che le esperienze condotte in vari centri hanno confermato la variabilità inter-laboratorio degli IR, negli ultimi 15 anni il valore di URL è stato profondamente modificato sulla base di studi di popolazione. Nei primi anni 2000, l'Accademia Americana di Biochimica Clinica (NACB) ha proposto il valore di 4,5 mUI/L, come evidenziato da numerosi studi su vaste casistiche (33). Dato che la distribuzione dei valori di TSH non è gaussiana, altri valori di URL sono stati proposti sulla base del criterio che il 95° percentile della popolazione esente da patologie tiroidee presenta valori <2,5 mUI/L: in particolare, un IR empirico compreso tra 0,3 e 3,0 mUI/L è stato suggerito come alternativa a quello sperimentale (53). La proposta di NACB di utilizzare un metodo diretto mediante esclusione a posteriori dei pazienti con anomalie immunologiche o ultrasonografiche ha prodotto numerosi studi che hanno

consentito di affermare che:

- le concentrazioni di TSH sono metodo- e popolazione-dipendenti;
- ciascun laboratorio dovrebbe determinare i propri valori sulla popolazione servita;
- in caso di ipotiroidismo, URL del TSH dovrebbe essere fissato a 4,0-4,1 mUI/L, quando il laboratorio non è in grado di calcolare i propri intervalli di riferimento (28, 54);
- utilizzando criteri rigorosi di selezione del gruppo di riferimento, la definizione dei valori di riferimento del TSH è particolarmente ardua nella fase di esclusione, dal momento che spesso una percentuale >40% viene esclusa (55), per la presenza di soggetti tireopatici subclinici o asintomatici.

Dato che la maggior parte dei laboratori di grandi dimensioni dispone di sufficienti dati correnti, storicizzati negli archivi dei sistemi informatici, i metodi indiretti possono essere utili quando applicati su popolazioni di adeguate dimensioni (>2000 individui): il presupposto di tale metodologia è che la maggior parte dei dati prodotti dal laboratorio derivano da indagini di screening e si riferiscono a soggetti non affetti da patologie che influiscono sulle concentrazioni dell'analita misurato. I TFT si prestano particolarmente a operazioni di questo tipo, anche se in letteratura sono scarsamente presenti esperienze di definizione degli IR utilizzando i metodi indiretti su casistiche particolarmente numerose (56-58).

I test tiroidei discordanti e il commento interpretativo del laboratorio

In alcune nazioni, e particolarmente in Italia, l'impiego della strategia del TSH come esame di prima linea non è particolarmente diffusa, come retaggio culturale

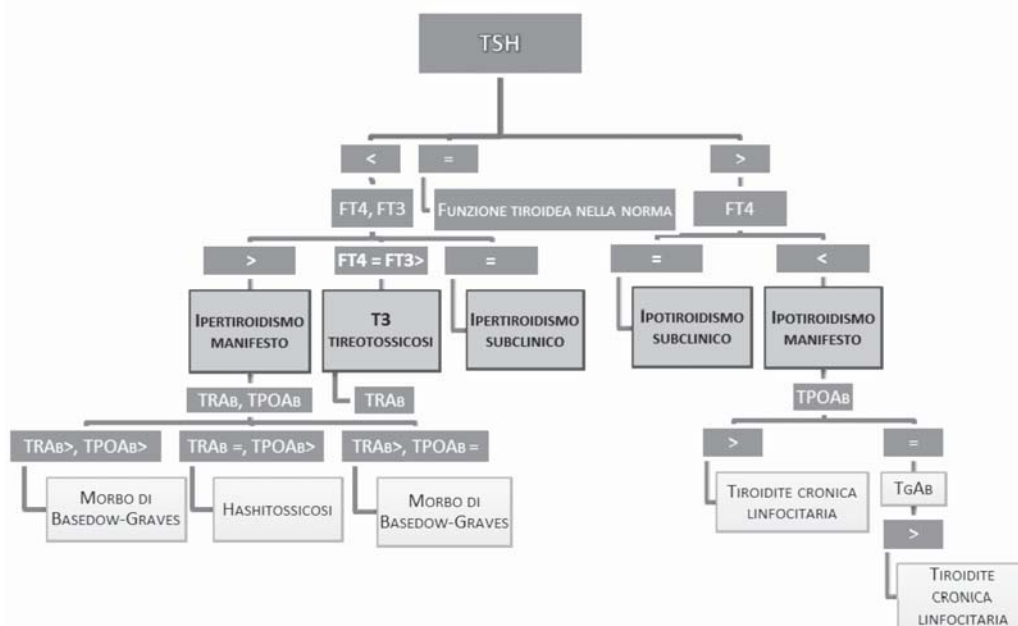


Figura 1

Algoritmo del "TSH riflesso" esteso agli autoanticorpi tiroidei.

TRAb, anticorpi anti-recettore TSH; TPOAb, anticorpi anti-tireoperossidasi; TgAb, anticorpi anti-tireoglobulina.

dell'impiego di esami a profilo per garantire la maggiore sensibilità diagnostica alle indagini di laboratorio per lo studio della funzionalità tiroidea in voga negli anni '80 e '90 e come effetto collaterale della rapida diffusione di metodi immunometrici, isotopici o non-isotopici, e della loro implementazione su piattaforme analitiche ad alta automazione. Ne è conseguito il crescente incremento di richieste di TFT nella popolazione, dimostrato da numerose indagini di tipo epidemiologico condotte negli ultimi anni (59).

L'appropriatezza della richiesta di TFT rimane controversa e la pratica medica può variare notevolmente in base alle indicazioni delle linee guida che sull'argomento si sono susseguite negli ultimi 10 anni. Gli studi che hanno indagato i vari "pattern" di richiesta applicati in vari Paesi indicano che la frequenza di richiesta dei TFT multipli è più alta di quella del TSH da solo: uno studio recente condotto in India segnala che la richiesta di TFT multipli (TSH, FT3, FT4) rappresenta ~47,5% del totale (59), mentre il solo TSH raggiunge il 46%; in altre sedi, tuttavia, il valore del TSH da solo supera il 70% del totale (60).

L'impiego esteso dei TFT a profilo o in combinazione (TSH e FT4, TSH e FT3, TSH, FT4 e FT3) non è in assoluto considerato un approccio inappropriato, in quanto spesso sottende una particolare attenzione a possibili mancate diagnosi, quali quelle dell'ipotiroidismo centrale (per disordini ipotalamici e/o ipofisari), malattie non tiroidee concomitanti, recente trattamento con tireostatici, resistenza all'ormone tiroideo (sindrome di Refetoff), adenoma ipofisario TSH-secerne (TSHoma) (61). Queste rare condizioni possono risultare non

diagnosticate, in quanto spesso il valore di TSH è compreso all'interno degli IR, anche se rappresentano non più del 1% delle condizioni cliniche di disfunzione tiroidea.

Al di là di considerazioni di carattere diagnostico, l'impiego del TSH quale test di prima linea presenta rilevanti vantaggi di carattere economico. Va inoltre segnalato che la strategia diagnostica dei TFT a profilo o in combinazione genera una quota non irrilevante di risultati discordanti, che comportano ulteriori costi e una progressiva medicalizzazione del paziente. In questo senso, se nella maggior parte dei casi la combinazione dei TFT conferma l'eu-, l'ipo- o l'ipertiroidismo, tuttavia, in una percentuale significativa i risultati di laboratorio non concordano con il quadro clinico e danno luogo a un quadro inusuale: tra i 7 quadri possibili descritti nella Figura 2, i 3 al centro sono da considerare concordanti con le condizioni fisiopatologiche e con i meccanismi di "feedback" dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide, mentre i 4 rimanenti richiedono un intervento specifico del laboratorio come ausilio all'interpretazione e alla diagnosi clinica (62).

L'impiego di un referto interpretativo del laboratorio in tutte le condizioni in cui i TFT sono discordanti consente di indirizzare la diagnosi verso le forme comuni o meno comuni di disfunzione tiroidea, una volta che venga confermata l'accuratezza analitica del dato (necessità di una ripetizione dell'esame, ricerca di possibili interferenti); quest'ultimo aspetto rappresenta da sempre una sfida per il laboratorio, data la gamma di sostanze interferenti negli immunodosaggi, dove spesso l'identificazione dell'interferente risulta

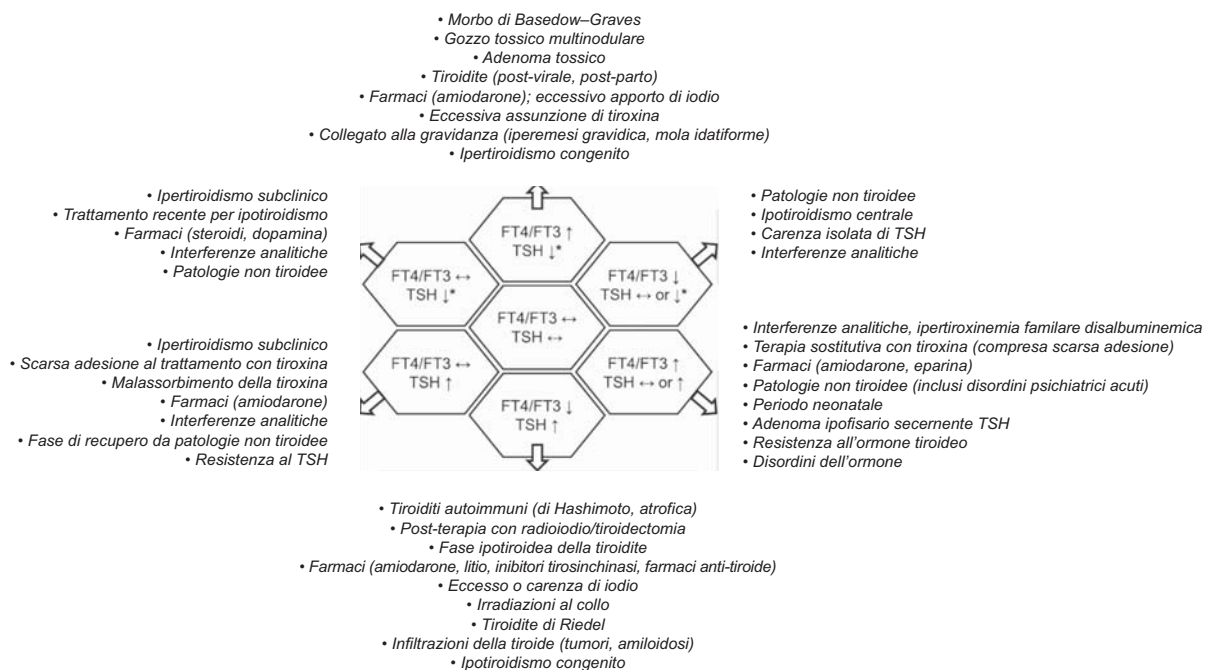


Figura 2

Differenti quadri degli esami di funzionalità tiroidea e loro cause. Modificata da Koulouri O et al (62).

L'asterisco indica che il TSH può essere completamente (ad es., nell'ipertiroidismo primario) o parzialmente soppresso (cioè misurabile, ma al di sotto del limite inferiore di riferimento)].

impossibile, determinando quella che è nota come 'storia infinita' senza risultato (63, 64).

I quadri possibili e il corrispondente referto interpretativo del laboratorio sono i seguenti:

- 1) TSH, FT3, FT4 in concentrazioni fisiologiche. Condizione di eutiroidismo.
- 2) TSH diminuito, FT4 (e FT3) aumentati. Quadro di ipertiroidismo primario [cause principali: morbo di Basedow-Graves e gozzo multinodulare; cause meno frequenti: tiroiditi e impiego di farmaci (amiodarone)].
- 3) TSH aumentato e FT4 (e FT3) diminuiti. Quadro di ipotiroidismo primario (comunemente dipendente da una tiroidite autoimmune, da un trattamento radiante o da una tiroidectomia).
- 4) TSH diminuito, FT4 (e FT3) in concentrazioni fisiologiche. Quadro di ipertiroidismo lieve o subclinico. In taluni casi possono essere in gioco l'impiego di farmaci o malattie tiroidee concomitanti o una condizione di interferenza analitica.
- 5) TSH aumentato, FT4 (e FT3) in concentrazioni fisiologiche. Quadro di ipotiroidismo subclinico (possono essere anche in gioco una non corretta terapia sostitutiva con L-tiroxina, la sindrome di Refetoff, l'impiego di amiodarone o una condizione di interferenza analitica).
- 6) TSH nei limiti fisiologici o diminuito, FT4 (e FT3) diminuiti. Quadro di ipotiroidismo centrale o di deficit isolato di TSH (spesso è tuttavia il risultato di un'interferenza analitica).
- 7) TSH nei limiti fisiologici o aumentato, FT4 (e FT3) aumentati. Quadro più complesso da diagnosticare, ma anche in questo caso spesso è presente un'interferenza analitica (62).

Come detto più sopra, in assenza di un commento interpretativo di laboratorio sulla possibile fisiopatologia della non concordanza tra i TFT, si realizza spesso un processo di medicalizzazione del soggetto, che prevede un iter diagnostico lungo e complesso, le cui tappe sono rappresentate da ripetizione dei TFT presso lo stesso o un altro laboratorio, per confermare i risultati, nell'ipotesi di un errore analitico; visita endocrinologica; ecografia tiroidea, nel caso del sospetto di ipotiroidismo, e/o scintigrafia tiroidea, nel caso del sospetto di ipertiroidismo.

Appropriatezza della richiesta di TFT: il decalogo delle raccomandazioni

Sulla base di esperienze simili proposte in letteratura (12), vengono di seguito presentate delle raccomandazioni sotto forma di un decalogo che deve guidare il clinico verso una più appropriata prescrizione dei TFT.

1. I TFT non vanno utilizzati per lo screening di popolazione, ma per l'accertamento diagnostico su pazienti con sintomatologia clinica ascrivibile a disfunzione tiroidea e per il monitoraggio dei soggetti in trattamento per tireopatie.
2. La misurazione del TSH è l'esame più affidabile per

la diagnosi di disfunzione tiroidea, per la valutazione della terapia sostitutiva con L-tiroxina e della terapia soppressiva (tireostatica) con anti-tiroidei.

3. La misurazione del TSH va effettuata con metodi immunometrici ad alta sensibilità.
4. Il "TSH riflesso" è lo strumento pratico più comune per l'accertamento di disfunzione tiroidea, mediante l'impiego di algoritmi diagnostici estesi non solo a TSH, FT4 e FT3, ma anche agli autoanticorpi (TPOAb, TgAb, TRAb), grazie alla disponibilità di metodi automatizzati nelle piattaforme analitiche commerciali in grado di completare il profilo.
5. Il corretto impiego del "TSH riflesso" presuppone la definizione del corretto IR dei TFT presso i laboratori che impiegano questa procedura.
6. L'impiego dei TFT a profilo o in combinazione (TSH e FT4, TSH e FT3, TSH, FT4 e FT3) è utile in limitate condizioni, quali l'ipotiroidismo centrale (per disordini ipotalamici e/o ipofisari), le malattie non tiroidee concomitanti, il recente trattamento con tireostatici, la resistenza all'ormone tiroideo (sindrome di Refetoff) o l'adenoma ipofisario TSH-secernente (TSHoma).
7. I quadri dei TFT fisiologici o discordanti necessitano di un referto interpretativo del laboratorio.
8. L'uso inappropriato dei TFT può determinare pratiche mediche inutili e potenzialmente dannose per il paziente (65).
9. L'esame più appropriato per la diagnosi delle tiroiditi autoimmuni è la determinazione dei TPOAb.
10. La determinazione dei TRAb è fondamentale nella fase diagnostica dell'ipertiroidismo autoimmune.

MALATTIA RENALE CRONICA

La CKD rappresenta un problema maggiore di salute pubblica e può essere oggi considerata come un'epidemia. Secondo uno studio recente (66), nel 1990 la CKD era al 36° posto tra le cause di morte più frequenti, mentre nel 2013 è salita al 19° posto. La frequenza della malattia nel mondo è compresa tra 4% (nei paesi asiatici e, in generale, in quelli meno sviluppati) e 7,7% negli Stati Uniti (67); in Italia è intorno al 7% (68).

Secondo la classificazione di Levey et al. (69), l'evoluzione della malattia segue diverse fasi: dalla fisiologia si passa a una condizione di rischio (il soggetto, cioè, ha fattori di rischio riconosciuti, ma non ha né albuminuria né filtrato glomerulare ridotto); segue la fase del danno renale (stadio 1 di malattia, caratterizzato da un filtrato glomerulare fisiologico, ma con segni di danno renale, come albuminuria o danni al segmento urinario), gli stadi 2-4, che identificano fasi successive di riduzione del filtrato glomerulare e lo stadio 5, che corrisponde all'insufficienza renale, e richiede la sostituzione della funzionalità.

A questa stadiazione della malattia è stato associato un piano di azioni (70): nella popolazione generale, per individuare i soggetti che hanno segni iniziali di malattia, è necessario uno screening; in presenza di fattori di rischio occorre trattare i soggetti per prevenire che si

instauri il danno renale; il trattamento va poi continuato quando la malattia si è manifestata. Quando l'insufficienza è tale che il trattamento non è più sufficiente, si ricorre alla dialisi e al trapianto.

La stadiazione è importante per due motivi: è collegata in modo diretto con il rischio cardiovascolare e consente di valutare il rischio di arrivare agli stadi avanzati di malattia (che richiedono dialisi e trapianto). I classici fattori di rischio (età, ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, fumo) colpiscono in egual misura cuore e rene. Nello stadio 1 di malattia (quando il filtrato è ancora conservato), si assume che il rischio di malattia cardiovascolare sia quello standard. Mentre la funzione renale si riduce fino allo stadio terminale, il rischio di morte per cause cardiovascolari cresce in modo speculare. Allo stadio 5, il rischio di morte cardiovascolare è pari a 3,6, cioè del 360% più alto rispetto a quello standard. Va sottolineato che si tratta di un rischio "fully adjusted", cioè che non dipende più dagli altri fattori di rischio cardiovascolare; ciò significa che quando il rene non funziona si ha un alto rischio di morte che non dipende dalle cause che hanno indotto la malattia renale, ma da fattori peculiari presenti nei pazienti con CKD. Tra questi, il principale è l'espansione di volume occulta, poi l'anemia, l'ipoalbuminemia e l'aumento della proteina C reattiva nel siero (l'insieme delle ultime due condizioni è chiamato sindrome malnutrizione-infiammazione), l'iperfosfatemia, l'accumulo di dimetil-arginina simmetrica e l'elevata attività simpatica. Questi due ultimi fattori non si misurano nella pratica, ma negli studi clinici hanno dimostrato un legame con il rischio di danno renale e cardiovascolare.

Secondo i risultati di un grande studio di popolazione (71), un individuo che ha avuto un infarto del miocardio ha un alto rischio di averne un altro. Confrontando il rischio di infarto per un paziente con filtrato <60 mL/min (limite che configura un filtrato ridotto) con quello di un paziente che ha avuto un infarto precedente, ma senza CKD, e con quello di un paziente diabetico, emerge che il rischio per chi ha un filtrato basso è circa la metà di quello di chi ha avuto precedente infarto, ma è molto più alto di quello di un diabetico. Se però si abbassa la soglia del filtrato a 45 mL/min e si considera anche la proteinuria, il rischio risulta pari a quello di chi ha avuto un precedente infarto. Dal punto di vista del rischio di infarto, quindi, avere una CKD è come aver già avuto un infarto. Se si considera la mortalità, un soggetto con filtrato <60 mL/min ha un rischio più alto rispetto a chi ha avuto un precedente infarto e 3 volte maggiore rispetto a chi ha il diabete.

In base ai dati epidemiologici disponibili, si stima che un uomo di 65 anni abbia il 3% di probabilità di andare in dialisi; a 80 anni il rischio sale al 5% (72). Il problema è quindi serio e, viste le dimensioni, sarebbe importante attuare una politica di screening. Tuttavia, per poter affermare che lo screening è realmente utile è necessario operare uno studio clinico controllato; purtroppo non sono disponibili dati di questo tipo per la CKD. In mancanza di essi è necessario costruire dei

modelli con le informazioni a disposizione per valutare il rapporto costo-efficacia di un intervento di screening. Il parametro che si utilizza nelle analisi di costo-efficacia è il "quality adjusted life years" (QALY), che esprime gli anni di vita guadagnati, ponderati per la qualità di vita. In pratica, se un soggetto ha un evento cardiovascolare, gli anni di vita successivi avranno una qualità di vita più bassa: si stima che sia circa la metà. In altre parole, la qualità di vita peggiora a causa dell'evento tanto che è come se il paziente visse la metà degli anni. Il QALY è un concetto economico, perché attribuisce un valore agli anni di vita, che varia da paese a paese in quanto stabilito con decisione politica: un QALY negli Stati Uniti vale 50.000 dollari, nel Regno Unito 20.000-30.000 sterline.

Uno screening annuale nella popolazione generale a partire da 50 anni non è costo-efficace (cioè il suo costo è sopra la soglia); se però si concentra l'attenzione solo sui soggetti ipertesi, sotto i 70 anni, lo screening è costo-efficace. Nei pazienti diabetici, poi, lo screening annuale risulta sempre costo-efficace; infine, se lo screening viene fatto ogni 2 anni, è costo-efficace anche in tutti i soggetti ipertesi (73). Anche in mancanza di uno studio clinico, quindi, si può affermare che è conveniente fare lo screening per la CKD nei pazienti diabetici e negli ipertesi, come suggerito dalle linee guida statunitensi ed europee, dato che il peso economico degli eventi cardiovascolari è molto alto (74).

In Italia, come detto, si stima che la CKD abbia una frequenza intorno al 7%: ciò significa che oltre 4,2 milioni di persone hanno CKD negli stadi 1-5. In termini di incidenza di infarto, questo significa che oltre 37.500 infarti del miocardio sono attribuibili a CKD. Valutando in ~10.000 euro il costo per un infarto, questo si traduce in una spesa totale di ~375 milioni di euro; riducendo questo valore di ~20% per tenere conto della sovrapposizione con i fattori di rischio classici (un processo detto analisi di sensibilità) si ottiene una stima di spesa complessiva di ~300 milioni di euro.

In sintesi, si può affermare che, dato che la CKD è prevalente nella popolazione generale e la sua frequenza è in crescita, il rischio cardiovascolare associato a questa patologia è dello stesso ordine di quello che si osserva nei soggetti che hanno avuto un precedente infarto del miocardio; il carico economico è quasi insostenibile per i sistemi sanitari (~300 milioni/anno per infarti nei pazienti con CKD) e quindi è necessario applicare politiche di screening mirate a soggetti ipertesi, obesi, diabetici e attuare strategie di prevenzione del rischio preferibilmente con una visione multispecialistica.

Determinazione del filtrato glomerulare e standardizzazione della determinazione della creatinina

La misura della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è lo standard clinico per la valutazione della funzionalità renale (70). In passato, la modalità di

riferimento per la misura della GFR era la "clearance" dell'inulina, utilizzata attualmente solo in situazioni molto particolari per la sua complessità di esecuzione. Attualmente, il "gold standard" per la misura della GFR prevede l'uso di iotalamato (75) o ioexolo (76). La misurazione avviene effettuando un'iniezione endovenosa di un quantitativo conosciuto della sostanza e la "clearance" viene calcolata in base alla cinetica della riduzione della sua concentrazione plasmatica, valutata tramite prelievi seriati. Questi metodi sono disponibili solo in pochi centri specialistici e non possono essere applicati alla popolazione generale: per questo motivo sono state sviluppate formule che consentano una stima della GFR (eGFR) sulla base della sola determinazione della creatinina plasmatica. Quelle attualmente utilizzate sono la formula di Cockcroft-Gault, la "MDRD", la "CKD-EPI", la formula di Schwartz (in ambito pediatrico) e quelle basate sulla cistatina C.

La formula di Cockcroft-Gault fu sviluppata nel 1976 per confronto con la "clearance" della creatinina (77). La formula MDRD ("Modification of Diet in Renal Disease study") (78) è sufficientemente accurata in soggetti con CKD, mentre per soggetti con GFR fisiologica tende a sottostimare. Con questa formula il valore che si calcola è per il 90% dei soggetti entro il $\pm 30\%$ dal valore vero ottenuto con il "gold standard". La formula CDK-EPI è stata proposta nel 2009 sulla base di uno studio condotto su 8000 soggetti e poi validata su altri 4000 (79); nella popolazione in studio era compresa anche una percentuale di soggetti sani. Si tratta di una formula, che tiene conto di sesso, età, etnia e indica come calcolare la eGFR sia nei soggetti con funzionalità renale fisiologica, sia in quelli con malattia renale. La formula di Schwartz (modificata) si applica nei bambini e stima il filtrato glomerulare entro il $\pm 30\%$ dal valore misurato con il "gold standard" nel 87,7% dei casi (80).

Riguardo al calcolo dell'eGFR sono state formulate alcune raccomandazioni dirette specificamente ai laboratori:

- 1) per calcolare eGFR i laboratori devono utilizzare l'equazione CKD-EPI;
- 2) il valore dell'eGFR deve essere riportato arrotondato al numero intero, usando negli adulti come unità di misura mL/min per 1,73 m²;
- 3) i laboratori devono classificare i valori di eGFR <60 mL/min per 1,73 m² come ridotta funzionalità;
- 4) i laboratori devono misurare la creatinina con un metodo riferibile al materiale di riferimento internazionale e con "bias" minimo verso il metodo di riferimento (spettrometria di massa con diluizione isotopica);
- 5) i valori di creatininemia devono essere riportati arrotondati al numero intero quando si usano le unità SI (ad es., 127 $\mu\text{mol/L}$) e con 2 decimali quando si usano le unità tradizionali (ad es., 0,95 mg/dL).

Le formule hanno alcuni limiti (trasformano una concentrazione di sostanza in velocità di flusso, con una operazione scorretta dal punto di vista metrologico; non

hanno variabili aggiuntive, ma aggiungono incertezza legata ai fattori per il calcolo), ma presentano il vantaggio indubbio di fornire un numero direttamente interpretabile e confrontabile con valori decisionali universalmente accettati.

Tutte le formule sopra descritte sono basate sulla misura della concentrazione della creatinina serica (sostanza endogena che deriva dalla deidratazione della creatina, prodotta dal fegato e utilizzata soprattutto dal tessuto muscolare). Le concentrazioni sieriche di creatinina dipendono da quelle della creatina e queste, a loro volta, variano in funzione della massa muscolare. L'apporto di carne comporta l'introduzione di quantità elevate di creatinina e fino al 30% della creatinina eliminata è di origine alimentare. La creatinina viene eliminata a livello renale principalmente per filtrazione glomerulare, ma in una percentuale variabile tra 5% e 15% anche per secrezione a livello tubulare. La sua dipendenza dalla massa muscolare fa sì che la concentrazione della creatinina vari in funzione dell'età e del sesso: nell'anziano la creatinina prodotta diminuisce perché la massa muscolare si riduce, ma cala anche la GFR; infine, i valori si abbassano in gravidanza.

La creatininemia possiede un basso indice di individualità, dato dal rapporto tra variabilità intra- e inter-individuale. Questo implica che l'IR ha un minor valore nella sua interpretazione, perché la creatininemia di un soggetto può aumentare significativamente, ma restare comunque all'interno dell'IR. Gli IR ottenuti in uno studio del 2008 sono riportati nella Tabella 1 (81).

La relazione tra creatinina sierica e filtrato glomerulare non è lineare; piccoli aumenti della concentrazione della creatinina sono collegati a riduzioni importanti della GFR: una variazione a livello critico (1,00 mg/dL o 90 $\mu\text{mol/L}$) anche solo di 0,12 mg/dL (10 $\mu\text{mol/L}$) comporta una riduzione del 12% del valore della GFR.

Il metodo di determinazione della creatinina è standardizzabile in quanto esiste un sistema di riferimento formato da uno standard primario (NIST SRM 914), con il quale si può calibrare un metodo di riferimento (gascromatografia o cromatografia liquida con spettrometria di massa con diluizione isotopica). Con questo metodo, i laboratori di riferimento possono certificare un materiale di riferimento secondario commutabile (creatinina in siero umano) (ad es., NIST SRM 967), che può essere usato dai produttori per

Tabella 1

Limiti di riferimento per la creatinina sierica nell'adulto

Sesso	Unità di misura	2,5° percentile (90% CI)	97,5° percentile (90% CI)
Maschi	$\mu\text{mol/L}$	64 (63-66)	104 (99-107)
Maschi	mg/dL	0,71 (0,71-0,75)	1,18 (1,12-1,21)
Femmine	$\mu\text{mol/L}$	49 (46-55)	90 (83-103)
Femmine	mg/dL	0,55 (0,52-0,62)	1,02 (0,94-1,12)

CI, intervallo di confidenza.

calibrare i propri metodi e certificare i calibratori che vengono usati nei laboratori clinici. In questo modo i risultati ottenuti sono riferibili alla sostanza pura (82).

Tra i metodi disponibili commercialmente, quello cosiddetto di Jaffe, dal nome dell'autore che nel 1886 per primo lo ha proposto, più opportunamente denominato al picrato alcalino, si basa sulla reazione dell'acido picrico con la creatinina in ambiente alcalino. La reazione è poco specifica e ci sono alcuni interferenti positivi (chetoni e chetoacidi, glucosio, proteine, cefalosporine) e negativi (bilirubina) (83). I metodi enzimatici sono basati su due possibili schemi di reazione: quello che impiega creatinina idrolasi, creatinasi, sarcosina ossidasi e reazione finale di Trinder (84) e quello che utilizza creatinina deaminasi e glutammato deidrogenasi consumando NADH per una lettura nell'UV (85).

Le specifiche di qualità analitica per la misura della creatinina si possono basare sulla variabilità biologica, con un traguardo analitico per l'imprecisione $\leq 3\%$ e errore totale entro $\pm 9\%$. Considerando invece l'impatto sull'"outcome" clinico, un aumento di 0,3 mg/dL (26,4 $\mu\text{mol/L}$) indica l'insorgenza di danno renale acuto di stadio 1 (classificazione secondo "Acute Kidney Injury Network") (86). Il dato riportato nel documento SIBioC-Società Italiana di Radiologia Medica sulle contrastografie indica che un aumento $>5\%$ a 12 ore è predittivo di nefropatia da mezzo di contrasto (87). La qualità della misura della creatinina è quindi estremamente importante. I dati della letteratura suggeriscono che l'accuratezza dei metodi enzimatici è superiore a quella dei metodi basati sul picrato alcalino. In particolare, uno studio ha valutato la specificità di vari metodi commerciali rispetto a un metodo di riferimento in spettrometria di massa, in presenza di varie tipologie di possibili interferenti (83). Come atteso, i metodi basati sul picrato alcalino mostravano interferenze positive in presenza di glucosio, mentre il fattore di compensazione, introdotto per eliminare l'interferenza positiva da proteine, non riusciva a correggere le situazioni in cui albumina o proteine totali sono particolarmente elevate o ridotte. In sintesi, l'influenza degli interferenti è meno frequente con i metodi enzimatici, che in generale hanno maggiore precisione, sono più robusti e garantiscono quindi risultati più affidabili; il vantaggio dei metodi enzimatici è particolarmente evidente nei pazienti diabetici e nei soggetti pediatrici.

Di seguito, alcune indicazioni da applicare nella pratica di laboratorio:

- a) data la dispersione dei risultati per valori di eGFR >90 mL/min per $1,73$ m², per valori superiori a questa soglia è opportuno indicare il risultato nel referto come eGFR >90 mL/min per $1,73$ m²;
- b) è importante utilizzare un metodo analitico con ottima precisione e minimo "bias", soprattutto alle concentrazioni vicine all'URL;
- c) se si referta la creatinina in mg/dL, usare 2 cifre decimali;
- d) poiché la formula per il calcolo del filtrato glomerulare

non è applicabile a tutti i soggetti, è importante aggiungere la seguente nota esplicativa nel referto: "In presenza di soggetto appartenente a gruppo etnico afro-americano, moltiplicare il risultato per il coefficiente 1,157 (CKD-EPI). L'eGFR non è applicabile in gravidanza, a soggetto defedato e/o affetto da patologie multiple, negli estremi di massa corporea, massa muscolare, stato nutrizionale, nei gruppi etnici orientali: in questi casi è indicata la valutazione diretta della "clearance" renale".

Cistatina C nello screening della CKD

La cistatina C è una proteina di 13,3 kDa, prodotta da tutte le cellule nucleate e distribuita nel fluido extracellulare, liberamente filtrata e riassorbita e catabolizzata a livello del tubulo renale. La sua concentrazione sierica è meno influenzata dalla massa muscolare e dalla dieta rispetto a quella della creatinina; altri fattori non legati al filtrato glomerulare, che possono potenzialmente influenzare la concentrazione sierica di un marcatore di funzione renale (obesità, infiammazione, fumo), non interferiscono con la cistatina C. Gli studi effettuati nel corso del tempo hanno poi dimostrato che la "clearance" della cistatina è correlata strettamente con i valori ottenuti con il "gold standard" per la determinazione del filtrato glomerulare, dato che essa è filtrata liberamente e viene catabolizzata quasi totalmente ($>99\%$) nei tubuli renali. Gli aspetti favorevoli alla cistatina C come marcatore di filtrazione glomerulare, quindi, sono i seguenti:

- a) è indipendente dall'età, dal sesso e dalla massa muscolare (a differenza della creatinina);
- b) è prodotta costantemente in tutte le cellule nucleate;
- c) è filtrata liberamente dal glomerulo;
- d) è completamente riassorbita e catabolizzata dal tubulo;
- e) non è secreta dal tubulo renale (diversamente alla creatinina).

Quindi, molti dei fattori che influenzano la creatininemia non hanno effetto sulla cistatina C.

La cistatina C è misurabile con metodi immunoturbidimetrici e immunonefelometrici. Studi di meta-analisi hanno confrontato sensibilità e specificità della cistatina C rispetto alla creatinina, rilevando una superiorità della prima (88, 89). Nonostante ciò la misura della cistatina C nella malattia renale è richiesta raramente per motivi clinici (l'impiego della cistatina C non sembra modificare il processo decisionale clinico ed esistono condizioni cliniche confondenti come la terapia steroidea e le malattie tiroidee), analitici (standardizzazione non ottimale dei risultati tra i vari metodi), post-analitici (eterogeneità degli IR, differenziati per età e sesso, e dei valori decisionali), gestionali (il TAT è superiore a quello della misura della creatinina) ed economici (il costo è superiore).

In letteratura sono riportate differenze significative nella determinazione della cistatina C tra laboratori (90), anche se è assistito negli ultimi anni a un significativo miglioramento dovuto alla disponibilità del materiale di

riferimento ERM DA471 (91).

Recentissime valutazioni indicano tuttavia che esiste ancora una dispersione dei valori rispetto al "target", sebbene ridotta rispetto a qualche anno fa, e che alcuni sistemi analitici hanno prestazioni migliori di altri in termini di esattezza (92). Si può però affermare che in generale la cistatina non ha livelli di standardizzazione peggiori della creatinina e che in particolare essa ha una migliore accuratezza diagnostica quando il filtrato è lievemente alterato: in queste condizioni la stima con la creatinina risente di numerosi fattori che la influenzano.

Dal punto di vista clinico, è importante valutare se la cistatina possa intercettare malattie renali allo stadio preclinico. Uno studio ha messo a confronto la determinazione del filtrato glomerulare effettuata con il "gold standard" iotalamato con la cistatina C e con la formula MDRD (che utilizza la creatinina) nel corso della storia naturale della malattia diabetica (93). I risultati indicavano che nella fase preclinica (quando cioè il filtrato non è ancora ridotto), la misura ottenuta con iotalamato e la stima effettuata con la cistatina C erano simili tra loro, ma molto diverse da quella ottenuta con la formula MDRD; quando il filtrato si riduce, le stime diventano tutte sovrapponibili. Vi è quindi maggiore probabilità di evidenziare un'iniziale riduzione del volume di filtrato glomerulare con la cistatina C piuttosto che con la creatinina.

Le formule proposte per eGFR con la cistatina C sono numerose, specialmente nella popolazione pediatrica. Per stabilire quale sia la migliore, bisogna considerare due requisiti: la formula deve essere ottenuta e valutata da un confronto con il metodo di riferimento e in coorti di popolazione. La sola formula che risponde a questi requisiti è l'equazione CKD-EPI.

Nelle linee guida KDIGO, per la valutazione iniziale della CKD si raccomanda l'uso della creatinina e la stima della eGFR tramite formula CKD-EPI (70). Si consigliano però esami aggiuntivi, come cistatina C o la misura della "clearance" della creatinina, per la conferma della diagnosi, quando la stima del filtrato basato sulla creatinina sierica è meno accurata.

Dagli studi emerge che la stima del filtrato fatta attraverso la misura di creatinina e cistatina in combinazione modifica il rischio relativo e il numero di soggetti individuati come portatori di CKD rispetto alla stima fatta con la sola creatinina (94). La raccomandazione è quindi quella di determinare la cistatina C nei soggetti adulti con volume di filtrato (stimato con formule che si basano sulla creatinina) compreso tra 45 e 59 mL/min/1,73 m² e senza alterazione di altri marcatori di danno renale. Se la determinazione con la cistatina dà un valore di eGFR <60 mL/min/1,73 m², la diagnosi viene confermata; per valori superiori, la diagnosi deve essere considerata scorretta. Negli studi effettuati è emerso che la riclassificazione riguarda il 16,8% dei soggetti inizialmente individuati come portatori di CKD. Inoltre, nei pazienti in cui il filtrato stimato con l'aggiunta della cistatina è compreso tra 45 e 59 mL/min/1,73 m² la prognosi è peggiore e in questi casi sono importanti gli

interventi clinici precoci.

Le linee guida raccomandano anche che la misura della cistatina C sia riportata con una formula e non solo in concentrazione. I laboratori devono utilizzare metodi standardizzati e la formula CKD-EPI per la refertazione.

La cistatina può essere inoltre utilizzata come marcatore di mortalità cardiovascolare (95).

Albuminuria nella diagnosi e nella classificazione della CKD

L'albuminuria è utilizzata per la definizione clinica di CKD e per la classificazione della malattia. I valori di albuminuria sono suddivisi in classi, per ognuna delle quali sono definiti i valori decisionali (96). Nella linea guida KDIGO (70) si trovano tabelle di rischio nelle quali la presenza di albuminuria (suddivisa nelle varie classi) è combinata con le diverse classi di eGFR per definire il livello di rischio. Inoltre, sempre in combinazione con la eGFR, essa serve per definire la frequenza del monitoraggio, che dovrà essere maggiore al crescere del livello di rischio. Va infine osservato che le concentrazioni di albuminuria sono correlate positivamente con la mortalità totale e con quella cardiovascolare, indipendentemente dagli altri fattori di rischio e dalla GFR (97).

Le indicazioni che provengono dalla linea guida KDIGO (70) sono le seguenti:

- per la valutazione iniziale di una proteinuria utilizzare (in ordine di preferenza): rapporto albumina/creatinina (ACR), rapporto proteine totali/creatinina (PCR), strisce reattive con lettura automatica, strisce reattive con lettura manuale;
- utilizzare in ogni caso il primo campione di urine del mattino e non la raccolta delle 24 ore, che rappresenta il "gold standard", ma è gravata da rischi di inaccuratezza della raccolta;
- per la popolazione pediatrica, l'ordine di preferenza tra ACR e PCR è invertito.

È raccomandato utilizzare la prima minzione del mattino in quanto questo è il campione che correla meglio con l'escrezione nelle 24 ore, mostra la variabilità biologica più bassa, presenta la concentrazione di proteina più bassa e consente di evitare la variabilità dovuta alla postura e all'esercizio fisico. Per quanto riguarda la variabilità biologica, una rassegna ha fornito dati importanti, indicando che in oltre il 70% degli studi analizzati, il primo campione del mattino presentava la variabilità biologica più bassa (98).

Altre indicazioni presenti nella linea guida KDIGO e relative al laboratorio clinico sono le seguenti:

- è opportuno riportare sempre il valore di ACR (o PCR) assieme al valore dell'albuminuria;
- vanno abbandonati i termini micro- e macroalbuminuria perché possono essere confondenti;
- un risultato positivo su un campione di urina "random" deve essere confermato sul primo campione del mattino;
- un risultato positivo ottenuto con strisce reattive deve

essere confermato con il metodo in chimica liquida sul primo campione del mattino;

- e) in caso sia necessaria una stima più accurata, deve essere utilizzato un campione delle 24 ore;
- f) se si sospetta una proteinuria diversa dall'albuminuria, è raccomandato richiedere la determinazione delle proteine urinarie specifiche (ad es., α 1-microglobulina, proteina di Bence-Jones).

Per la misura dell'albumina nelle urine la standardizzazione non è semplice, ma non è ulteriormente rimandabile (99); al riguardo un gruppo di studio IFCC, che opera in collaborazione con il "National Kidney Disease Education Program" (NKDEP), si sta occupando di definire il sistema di riferimento per la standardizzazione in tutte le sue componenti (96). Attualmente il materiale di riferimento primario candidato è albumina umana ricombinante in soluzione acquosa (NIST SRM 2925) e il materiale secondario è albumina (e creatinina) sciolta in urina (NIST SRM 3666) (100). Questi materiali dovrebbero essere utilizzati per assegnare i valori ai calibratori commerciali; tuttavia, questi materiali sono in corso di validazione e non sono ancora disponibili: quindi al momento ai calibratori commerciali viene assegnato il valore utilizzando il vecchio materiale di riferimento per le proteine sieriche (ERM DA470), che ha una concentrazione adatta alle proteine del siero e quindi deve essere fortemente diluito per essere utilizzato per la misura delle proteine nelle urine; per la diluizione, però, manca un protocollo definito e questo crea problemi di assegnazione dei valori ai calibratori. Per quanto riguarda il metodo di riferimento, anche in questo caso esiste un metodo candidato basato sulla cromatografia liquida a diluizione isotopica e spettrometria di massa (101). Il metodo è ancora in fase di validazione per alcuni problemi relativi a discrepanze in singoli campioni (99). In questa situazione è quindi difficile definire le caratteristiche analitiche necessarie alla misura (96). Se, come emerge da esperienze condotte nel nostro paese (96), la variabilità interlaboratorio presenta risultati soddisfacenti, per quanto concerne l'esattezza invece, i "bias", metodo-dipendenti, risultano ancora elevati in alcuni casi (102).

Appropriatezza della richiesta dei test di funzionalità renale: il decalogo delle raccomandazioni

1. Un programma di screening della CKD non è appropriato nella popolazione generale, ma solamente se mirato a pazienti ipertesi, obesi, diabetici al di sotto dei 70 anni.
2. La stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) è lo standard clinico per la valutazione della funzionalità renale.
3. La formula CDK-EPI rappresenta la migliore soluzione per la stima del filtrato glomerulare negli adulti.
4. La formula di Schwartz rappresenta la migliore soluzione per la stima del filtrato glomerulare nei

bambini.

5. Per poter utilizzare le formule è necessario che il metodo di misura della creatinina sia standardizzato (riferibile al sistema di riferimento).
6. La cistatina C è raccomandata e va misurata in pazienti con stima del filtrato glomerulare (CDK-EPI) tra 45 e 59 mL/min/1,73 m² e senza danno renale, in pazienti pediatrici e nelle fasi iniziali del trapianto.
7. Per la valutazione iniziale di una proteinuria vanno utilizzati in ordine di preferenza: ACR, PCR, strisce reattive con lettura automatica, strisce reattive con lettura manuale, utilizzando in ogni caso il primo campione del mattino; per la popolazione pediatrica, l'ordine di preferenza tra ACR e PCR viene invertito.
8. Nel referto è opportuno riportare sempre il valore di ACR (o PCR) assieme al valore dell'albuminuria.
9. Vanno abbandonati i termini micro- e macroalbuminuria.
10. Un risultato positivo su un campione "random" deve essere confermato sul primo campione del mattino; un risultato positivo ottenuto con strisce reattive deve essere confermato con il metodo in chimica liquida sul primo campione del mattino.

MALATTIA CELIACA

La celiachia è un'enteropatia autoimmune a elevata prevalenza (presente nel 1% della popolazione) determinata dall'ingestione di cereali contenenti glutine in soggetti geneticamente suscettibili e rappresenta la fase finale di una serie di processi complessi che coinvolgono sia l'immunità innata sia quella adattativa, ancora largamente poco conosciuti (103). La prevalenza è sottostimata, in quanto per ogni soggetto diagnosticato, da 3 a 10 soggetti affetti dalla malattia non sono riconosciuti. Il picco di prevalenza della patologia è in netto aumento sia in Europa sia negli Stati Uniti e raddoppia ogni 15 anni circa, sia per le migliorate capacità diagnostiche sia per un reale incremento (104).

Dal punto di vista patogenetico, quello che accade quando la gliadina penetra la barriera intestinale è sufficientemente conosciuto. Il danno avviene a livello dell'intestino tenue prossimale: le alterazioni che si verificano al momento dell'introduzione del glutine sono complesse e coinvolgono sia l'immunità innata (con la produzione di interleuchina 15), sia quella adattativa (con l'attivazione del sistema immunitario), che viene amplificata dall'azione della transglutaminasi tissutale. Questo comporta una variazione di fattori bioumorali e cellulari, che sono responsabili del danno a livello prossimale, tale da provocare alterazioni dei villi intestinali con quadri che possono arrivare all'atrofia completa.

La celiachia è l'unica malattia autoimmune per la quale si riconosce un "trigger" ambientale, il glutine, una prolamina contenuta nel grano. Esistono però altre prolammine tossiche, presenti nel farro, nel kamut, nella segale e nell'orzo. È importante anche la genetica di predisposizione. Infatti, i geni dell'antigene di

istocompatibilità di classe seconda (HLA DQ2-8) spiegano ~40% del rischio genetico. Ambiente e geni, però, sono elementi necessari ma non sufficienti per la comparsa della celiachia: il 30% della popolazione generale ha gli stessi geni e viene a contatto con il glutine, ma solo 1% sviluppa la celiachia (103). La possibilità di sviluppare la malattia è legata alla presenza di cofattori, che non sempre vengono individuati, ma che fanno in modo che la malattia si slatenizzi in un determinato momento della vita dei soggetti predisposti. Contrariamente a quanto si pensava in precedenza, non si tratta quindi di una patologia pediatrica; anzi, la maggior parte dei soggetti la sviluppa in età adulta e nel 20% dei casi l'esordio è dopo i 60 anni.

Dal punto di vista clinico, le manifestazioni della malattia sono estremamente variabili e comprendono quadri che vanno da grave deterioramento delle condizioni generali (raro) a sintomi clinici sfumati (frequenti), spesso con assenza dei classici sintomi gastrointestinali. Nei bambini, i sintomi sono di solito più specifici: sintomi di tipo gastroenterologico (dolore, gonfiore addominale, ecc.), irritabilità e variazioni dell'umore. Negli adulti, invece, la malattia si presenta spesso in maniera sfumata o viene riscontrata casualmente; si stima che tra l'esordio della malattia e la diagnosi trascorrono in media 6 anni. In meno del 30% dei soggetti la malattia si manifesta con i sintomi addominali classici (diarrea, malassorbimento, gonfiore e dolori addominali), spesso molto sfumati.

Esistono gruppi a maggior rischio di sviluppare la malattia: familiari di primo e secondo grado di persone celiache, soggetti con deficit selettivo di IgA, soggetti con altre patologie autoimmuni o anomalie genetiche. Per i familiari di primo grado, il rischio è 10-15 volte più alto rispetto a quello della popolazione generale (105).

Diagnosi di celiachia

Fino a 10-15 anni fa la diagnosi veniva effettuata in base alla clinica e alla positività dei risultati di due biopsie intestinali; attualmente, grande importanza è attribuita ai marcatori sierologici, genetici e istologici. Gli esami sierologici sono molto più sensibili e specifici,

hanno costi più bassi e sono più diffusi. Tuttavia, spesso la loro interpretazione è dubbia, con presenza di falsi positivi e negativi. Sono disponibili dei test genetici, utili soprattutto in alcuni casi particolari. La differenza principale rispetto al passato, però, riguarda l'istologia: le nuove conoscenze hanno permesso di capire che la biopsia intestinale non è affidabile come si pensava e mostra invece oggi sensibilità e specificità inferiori rispetto alla sierologia. Il risultato dell'esame, infatti, è condizionato dalle modalità con cui viene eseguito. L'esame istologico su tutto l'intestino viene effettuato tramite la gastroscopia, che permette di raccogliere campioni in punti non predefiniti. La campionatura potrebbe quindi non essere sufficiente a individuare lesioni specifiche, se queste non sono distribuite in modo uniforme. Esiste poi una variabilità nell'interpretazione dell'esame da parte degli anatomopatologi, che porta a valutazioni diverse della gravità del danno. Inoltre, le lesioni più lievi (non atrofici) non sono necessariamente indicative di celiachia. Queste alterazioni infatti, riscontrabili in un'alta percentuale di soggetti adulti e caratterizzate dalla presenza di un infiltrato di linfociti CD3⁺, possono essere presenti in molte altre condizioni, indicate nei loro complessi con il termine di enterite microscopica.

La diagnosi di celiachia è quindi un processo che prevede la valutazione congiunta di dati clinici, sierologici e istologici (105). I marcatori sierologici hanno un ruolo fondamentale. Le loro caratteristiche sono riassunte nella Tabella 2. In caso di sospetto clinico, i marcatori di prima scelta sono gli anticorpi anti-transglutaminasi di classe IgA (anti-tTG IgA) e le IgA totali. Solo se si rileva un deficit di IgA, si misurano gli anticorpi anti-peptidi deamidati della gliadina (anti-DGP IgG). Vanno valutate non solo positività o negatività di questi marcatori, ma anche l'entità dell'incremento, che dà indicazioni sull'entità del danno intestinale (più forte è l'incremento, maggiore il livello di atrofia dei villi).

L'endoscopia può fornire indicazioni sulla presenza o meno della celiachia evidenziando alterazioni specifiche (ad es., riduzione o scomparsa delle pliche, aspetto a mosaico o evidenza dei vasi ematici sottostanti, che

Tabella 2

Caratteristiche dei principali marcatori sierologici di celiachia

Esame	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Valore predittivo positivo	Valore predittivo negativo
AGA IgA	85 (57-100)	90 (47-94)	18%	99%
AGA IgG	85 (42-100)	80 (50-94)	31%	99%
EMA	95 (86-100)	99 (97-100)	83%	99%
Anti-tTG IgA	98 (78-100)	98 (90-100)	72%	99%
Anti-tTG IgG	70 (45-95)	95 (94-100)	42%	99%
Anti-DGP IgA	88 (74-100)	95 (90-99)	44%	99%
Anti-DGP IgG	80 (63-95)	98 (90-99)	68%	99%

AGA, anticorpi anti-gliadina; EMA, anticorpi anti-endomisio; Anti-tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; Anti-DGP, anticorpi anti-peptidi della gliadina deamidata.

indicano una probabilità molto alta di lesioni atrofiche). Le recenti tecniche diagnostiche di tipo endoscopico (endoscopia ad alta risoluzione, endoscopia ad alta risoluzione con immersione in acqua, "narrow band imaging", video-endoscopia capsulare, endomicroscopia confocale *in vivo*) consentono di operare biopsie mirate e di individuare soggetti che altrimenti sfuggirebbero alla diagnosi.

È fondamentale che tutti gli esami diagnostici siano effettuati in dieta libera: non bisogna sospendere l'assunzione di glutine prima di aver affrontato il percorso diagnostico per non falsare i risultati degli esami.

Una dieta aglutinata seguita con la massima regolarità è fondamentale per la salute delle persone celiache. Infatti, l'eliminazione del glutine dalla dieta permette di avere un intestino strutturalmente quasi normale e funzionalmente integro. La quantità di glutine tollerata è di 10 mg al giorno e questa è una informazione molto importante da trasferire ai soggetti celiaci.

Individuare il soggetto celiaco, anche se quasi asintomatico, è molto importante in quanto nel tempo possono comparire complicanze. Le più significative sono la celiachia refrattaria (una condizione in cui i sintomi da malassorbimento e l'atrofia dei villi si mantengono anche in presenza di dieta aglutinata stretta da almeno 6-12 mesi), la digiuno-ileite ulcerativa e la sprue collagena (che comportano elevata mortalità), i linfomi e i tumori epiteliali. Il rischio di sviluppare una complicanza di quest'ultimo tipo si è ridotto nel tempo,

grazie alla possibilità di individuare (e di sottoporre quindi a dieta aglutinata) anche soggetti con forme più lievi rispetto al passato, caratterizzate da sintomi molto sfumati.

Algoritmi per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia

Esiste nelle linee guida internazionali una relativa eterogeneità nelle proposte di algoritmi per la diagnosi e il monitoraggio della celiachia. Di rilievo, quelle proposte recentemente da specialisti dell'area della Medicina di Laboratorio (105). Sul piano diagnostico-clinico, nuove conoscenze sono state rese disponibili negli ultimi anni: alla celiachia si sono affiancate una serie di reazioni avverse al glutine, che richiedono una diagnosi differenziale (106); è stata resa disponibile una nuova classificazione istologica semplificata (107); sono disponibili nuovi marcatori sierologici e genetici [anticorpi anti-gliadina (AGA) anti-DGP, HLA]; è possibile fare diagnosi anche senza biopsia, ma solo in casi specifici e limitati.

Le malattie correlate al glutine sono numerose e sono rappresentate nella Figura 3. In particolare, nei bambini l'allergia al grano può presentarsi con manifestazioni simili a quelle della celiachia, mentre negli adulti è rarissima e ha una sintomatologia del tutto diversa. La classificazione istologica è cambiata: la classica classificazione di Marsh-Oberhuber è stata sostituita da quella più semplice di Corazza-Villanacci; nel 2015 è stata proposta un'ulteriore semplificazione

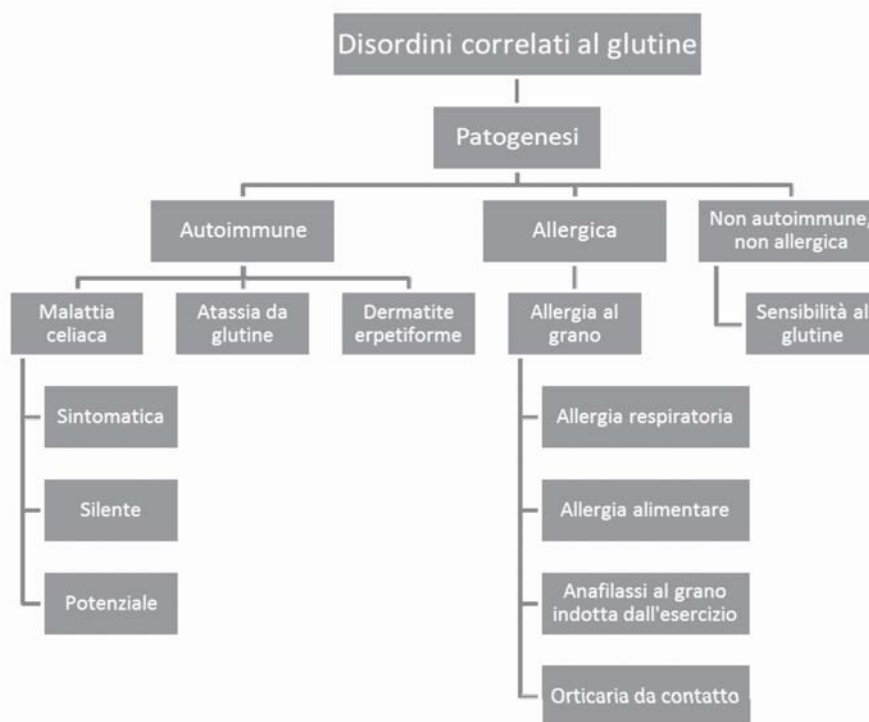


Figura 3
Spettro delle malattie correlate al glutine. Modificata da Sapone A et al. (106).

(classificazione di Villanacci), non ancora recepita nelle linee guida, ma che ha l'obiettivo di armonizzare il referto istologico (107). Infine, oggi si sa che soggetti con biopsia normale possono aver un infiltrato anticorpale anti-tTG a livello della mucosa gastrica e questo può essere importante per la diagnosi nel caso di biopsia non indicativa.

Per la diagnosi di celiachia la determinazione della concentrazione plasmatica degli anticorpi IgA anti-tTG è in generale più affidabile degli anti-DGP-IgA (108). Quest'ultimo esame ha però una predittività superiore nell'identificare soggetti con deficit di IgA nei bambini al di sotto dei 2 anni.

Per quanto riguarda il test genetico (presenza dell'antigene di istocompatibilità di classe seconda HLA DQ2/DQ8), esso è indicato come esame di ingresso per lo screening dei soggetti a rischio, prima della sierologia;

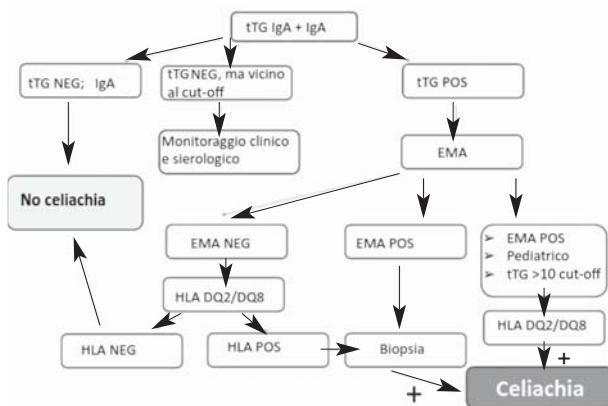


Figura 4
Algoritmo per la diagnosi di celiachia in soggetti con manifestazioni cliniche ed età >2 anni.
tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; EMA, anticorpi anti-endomisio.

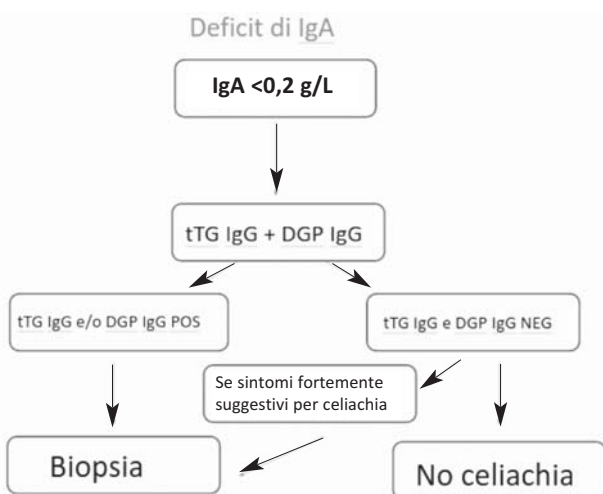


Figura 5
Algoritmo per la diagnosi di celiachia in soggetti con deficit di IgA.
tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; DGP, anticorpi anti-peptidi della gliadina deamidata.

qualche esperto ne indica l'uso alla nascita per i familiari di primo grado dei soggetti celiaci.

Numerosi studi supportano la possibilità di fare la diagnosi senza la biopsia: in particolare, uno studio ha indicato che con valori >10 volte il valore soglia di anti-tTG IgA il valore predittivo positivo dell'esame è del 100% (109). Le recenti linee guida dell'“European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition” (ESPGHAN) indicano che nei bambini sintomatici con anti-tTG >10 volte la soglia, confermati da anticorpi anti-endomisio (EMA) e da positività HLA DQ2/8, si può evitare la biopsia (110). Si tratta, però, dell'unico caso in cui è possibile porre la diagnosi di celiachia senza la biopsia.

Tra le varie proposte da parte delle recenti linee guida [soggetti con età >2 anni (Figura 4), soggetti con deficit di IgA (Figura 5), soggetti asintomatici appartenenti a gruppi a rischio (Figura 6)] esistono alcune controversie circa la collocazione della ricerca di EMA nella procedura diagnostica, l'esclusione di celiachia fatta senza biopsia in caso di anti-tTG IgA di poco oltre la soglia e di EMA negativi, e il valore soglia delle IgA totali per definire il deficit di IgA.

Per quanto concerne il “follow-up”, le linee guida ministeriali forniscono le seguenti indicazioni:

- effettuare un controllo entro 6-12 mesi dalla diagnosi e, successivamente, ogni 1-2 anni (salvo complicanze);
- eseguire a ogni controllo esame emocromocitometrico e dosaggio di anti-tTG IgA (o IgG in presenza di deficit di IgA);
- effettuare gli accertamenti ematici per il metabolismo del ferro (sideremia, ferritina) e la folatemia solo al primo controllo e, se alterati, ripeterli ai successivi controlli fino alla normalizzazione.

Poiché alla celiachia si associano con alta prevalenza le tiroiditi autoimmuni, è prevista anche la determinazione

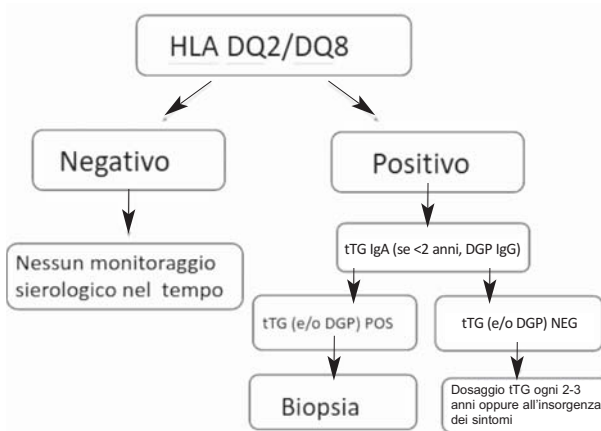


Figura 6
Algoritmo per la diagnosi di celiachia in soggetti asintomatici appartenenti a gruppi a rischio.
tTG, anticorpi anti-transglutaminasi; DGP, anticorpi anti-peptidi della gliadina deamidata.

di TSH e TPOAb alla diagnosi. Se entrambi negativi, si ripete il TSH ogni 3 anni; se entrambi sono alterati, occorre avviare il paziente al trattamento della tireopatia autoimmune; se solo uno è alterato, si deve effettuare una valutazione endocrinologica. Altri eventuali esami ematologici e strumentali vanno eseguiti solo in base alla valutazione clinica. La densitometria ossea va fatta solo nell'adulto, dopo 18 mesi di dieta senza glutine.

In conclusione, per la diagnosi di celiachia devono essere considerati diversi aspetti: la sierologia, il dato anatomopatologico, il genotipo e il dato clinico. Spesso, però, uno o più di questi elementi sono mancanti. Per questo motivo, alcuni esperti hanno proposto una procedura simile a quella già adottata in altre malattie autoimmuni, che non prevede algoritmi diagnostici complicati, ma definisce criteri classificativi per la diagnosi basati sugli elementi indicati; questa possibilità è stata ripresa dalle linee guida ESPGHAN, che hanno proposto l'applicazione di uno "score" con punteggi definiti, la cui somma, se si pone al di sopra di una soglia prestabilita, permette di porre la diagnosi di celiachia (110). Questi "score", però, non sono ancora stati validati da studi clinici che ne abbiano valutato il grado di predittività.

Specifiche di qualità della determinazione degli anti-tTG

Il valore predittivo negativo dei test per la diagnostica della celiachia è alto, ma solo gli anti-tTG di classe IgA e gli EMA hanno specificità e sensibilità elevate (Tabella 2). Alcuni studi hanno messo a confronto EMA, anti-tTG e anti-DGP (108, 111-113).

Per quanto riguarda la determinazione di anti-tTG IgA, in commercio sono disponibili diversi kit diagnostici, che utilizzano antigeni, unità e intervalli di misura differenti e suggeriscono diversi cut-off. Gli antigeni usati più di frequente sono di origine umana ricombinante da *Escherichia coli*, baculovirus o derivati da linee cellulari di mieloma, e gli antigeni purificati di tipo umano da eritrociti. Nei bambini, gli studi indicano che le prestazioni diagnostiche degli anti-tTG IgA sono dipendenti dal metodo utilizzato e dall'età del bambino. Il laboratorio deve suggerire l'antigene (umano ricombinante o purificato), il metodo immunoenzimatico (ELISA o chemiluminescenza) e il cut-off diagnostico. Inoltre, dovrebbe definire e monitorare le prestazioni analitiche degli esami.

Per quanto riguarda l'antigene utilizzato, una meta-analisi ha valutato kit con antigeni diversi, indicando che gli antigeni di origine umana, sia ricombinanti che purificati, hanno specificità e sensibilità superiori (114).

Per ottenere la migliore combinazione di sensibilità e specificità diagnostica per i metodi ELISA occorre utilizzare il cut-off di 17,5 U; per i metodi in chemiluminescenza la migliore combinazione di sensibilità e specificità si ottiene con un cut-off di 16 U. Numerosi studi hanno messo in luce come il cut-off nella determinazione di tTG IgA con lo stesso antigene e lo stesso metodo possa variare notevolmente. L'eterogeneità dei risultati degli esami condotti nei vari

laboratori è stata evidenziata nel 2009 da una ricerca, i cui risultati hanno messo in luce una grande variabilità nella sensibilità (69-93%) e nella specificità (96-100%) dei diversi metodi e un CV intrasaggio piuttosto ampio in alcuni laboratori (115).

Ruolo dell'HLA nella diagnosi di celiachia

La celiachia è una malattia autoimmune ad alta prevalenza con forme cliniche classiche e forme latenti e silenti: alla base di tutte c'è la suscettibilità genetica. Il principale fattore genetico predisponente alla malattia celiaca è l'aplotipo HLA DQ2/DQ8, che rende conto del 40% della predisposizione genetica. Il restante 60% è dovuto a molti altri fattori genetici, non del tutto noti.

I pazienti celiaci sono portatori dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8 nella quasi totalità dei casi; tuttavia, solo una piccola parte sviluppa la celiachia. Le molecole HLA DQ2/DQ8 vengono espresse dalle cellule dendritiche della mucosa dell'intestino e, nei portatori di questo aplotipo, le cellule hanno elevata affinità per i peptidi con carica elettrica negativa, come i peptidi deamidati della gliadina. La presenza dell'aplotipo favorisce l'innescare della risposta immunitaria, perché gli antigeni vengono presentati alle cellule T, che a loro volta danno il via al processo di autoimmunità.

L'HLA di classe II non comprende solo DQ2 e DQ8, ma una ampia varietà di possibili alleli, molti dei quali sono coinvolti nella predisposizione alle malattie autoimmuni o, in alcuni casi, sono protettivi. HLA entra nel *locus* del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), sul braccio corto del cromosoma 6, dove si trovano diverse regioni genetiche; quella di interesse per la malattia celiaca è la regione della classe II, che contiene una serie di geni, tra i quali HLA DQB1 e HLA DQA1, che sono in "linkage" con il *locus* DR. Il gene A1 codifica per la catena proteica α , il B1 per la catena proteica β ; nelle cellule che presentano l'antigene, queste proteine sono espresse a livello di membrana, in modo da formare un eterodimero. Tra i possibili alleli dei geni HLA DQA1 e B1, quelli direttamente coinvolti nella predisposizione alla malattia celiaca sono pochi e sono quelli che codificano per le proteine che concorrono a formare DQ2 e DQ8. Per quanto riguarda il DQ2, l'allele più importante è *02 del *locus* DQB1, che codifica la catena β dell'eterodimero HLA DQ2. Perché vi sia presenza di DQ2 è necessario avere questo allele; non è però sufficiente: occorre avere anche l'allele *05 del *locus* DQA1. Questi alleli si possono combinare in maniera molto variabile e complessa. Per il DQ8, invece, è necessaria la combinazione degli alleli *0302 del *locus* DQB1 e *03 del *locus* DQA1.

Per eseguire l'analisi di HLA DQ2/DQ8 sono disponibili molte opzioni, grazie alle tecniche di biologia molecolare. Per esempio, è possibile effettuare una "polymerase chain reaction" (PCR) allele-specifica con analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio oppure si può effettuare un sequenziamento. In realtà, però, l'obiettivo è individuare solo l'eventuale presenza dei 4 alleli direttamente coinvolti. Uno dei possibili metodi è un'analisi PCR in "real time", usando sequenze

specifiche, "primer" e sonde che riconoscono gli alleli di interesse. Si analizza il campione di DNA e, se si individua l'allele principale (*02 del *locus* DQB1), viene rilevato un segnale di amplificazione. Per poter affermare che il soggetto ha HLA DQ2 è necessario poi individuare anche l'allele *05 del *locus* DQA1, con lo stesso metodo. Si può poi verificare se *02 del *locus* DQB1 è in omozigosi o eterozigosi. Se il risultato è positivo, le varie combinazioni alleliche si traducono in un diverso rischio di malattia. Infatti, è condizione diversa avere tutti gli alleli di DQ2 e DQ8 rispetto ad avere il solo *02 del *locus* DQB1.

Esiste una notevole variabilità del rischio (116). I soggetti con DQ2 in omozigosi hanno un rischio molto elevato di essere celiaci, mentre quelli con il DQ8 hanno un rischio più contenuto. Per quanto riguarda i familiari, che sono soggetti a rischio, nella comunità scientifica si discute sull'opportunità di effettuare il test genetico. Se è negativo, infatti, la celiachia si può escludere e questo è un motivo a sostegno dell'opportunità dell'esame. Tuttavia, la probabilità che i familiari dei soggetti celiaci abbiano questo aplotipo e che l'esame risulti positivo è molto alta, e in questo caso non c'è nulla che si possa fare. Il problema quindi è tradurre nella pratica clinica il diverso rischio associato ai risultati dell'analisi genetica. Occorre decidere a chi e come effettuare il monitoraggio e con quale frequenza, dato il diverso livello di rischio. In un'esperienza recente sono stati valutati ~200 soggetti, con età media intorno a 20 anni, nei quali anti-tTG IgA e HLA DQ2 e DQ8 sono stati richiesti ed effettuati in modo inappropriato (117). ~40% dei soggetti è risultato negativo e, tra quelli positivi, la maggior parte aveva DQ2 in eterozigosi. Tra i soggetti analizzati, ~10-15% ha poi effettuato la gastroscopia. Tenendo conto dell'età, del sesso, dei valori di anti-tTG e dell'aplotipo HLA DQ2/DQ8 è risultato che il fattore che indice di più a effettuare la gastroscopia è il dato genetico.

Esistono moltissimi altri geni diversi da HLA che hanno un ruolo nella predisposizione alla malattia celiaca e ad altre malattie autoimmuni. Ogni variante non-HLA apporta un contributo minimo al rischio genetico associato all'HLA; è quindi difficile pensare di analizzare tutte le varianti e, in ogni caso, il loro significato clinico non è così rilevante. Per esempio, gli aplotipi "tumor necrosis factor (TNF) α ", a parità di HLA, aumentano il rischio di celiachia: in un soggetto ad alto rischio, la genetica del TNF consente di individuare differenze di rischio (116). Nella pratica clinica, però, il significato di queste varianti genetiche è al momento trascurabile.

In conclusione:

- il *locus* HLA è il principale fattore genetico di predisposizione alla malattia celiaca;
- gli aplotipi HLA DQ2 e DQ8 sono necessari, ma non sufficienti per lo sviluppo della patologia;
- la diagnosi nei bambini sintomatici viene posta se vi è la presenza contemporanea di HLA DQ2 o DQ8 e di livelli di tTG IgA >10 volte la soglia;
- l'assenza di HLA DQ2 e DQ8 consente di escludere la celiachia nei pazienti a rischio, che non

necessitano di ulteriori monitoraggi;

- esiste un gradiente di rischio di celiachia associato ai diversi aplotipi HLA DQ che derivano dalle varie combinazioni degli alleli HLA DQA1 and DQB1;
- la sola regione HLA è responsabile di ~40% della predisposizione genetica alla celiachia. Altri loci coinvolti saranno oggetto di ricerca in futuro.

Appropriatezza della richiesta degli esami diagnostici per la celiachia: il decalogo delle raccomandazioni

- La diagnosi di celiachia prevede l'integrazione di dati clinici, sierologici e istologici: è fondamentale che tutti gli esami diagnostici siano effettuati in dieta libera, evitando, in particolare, la sospensione dell'assunzione di glutine per non falsare i risultati degli esami.
- I biomarcatori di prima scelta sono gli anti-tTG IgA e le IgA totali. Se si rileva un deficit di IgA, si misurano gli anti-DGP IgG.
- L'esame genetico per la ricerca di HLA DQ2/DQ8 è indicato come esame di ingresso per lo screening dei soggetti a rischio, prima della sierologia: qualche esperto ne indica l'uso alla nascita per i familiari di primo grado dei soggetti celiaci.
- Gli esami diagnostici di ingresso per celiachia in soggetti con manifestazioni cliniche ed età >2 anni sono anti-tTG IgA e IgA totali.
- Gli esami di prima scelta per i soggetti con deficit di IgA sono anti-tTG IgG e anti-DGP IgG.
- L'esame più importante per i soggetti asintomatici appartenenti a gruppi a rischio è HLA DQ2/DQ8.
- Permane ancora controversa la collocazione dell'esame EMA nella procedura diagnostica.
- Nel referto diagnostico dei marcatori vanno chiaramente esplicitati l'antigene impiegato nel metodo, il metodo stesso e il valore soglia diagnostico.
- Nei bambini sintomatici con presenza contemporanea di HLA DQ2/DQ8 e livelli elevati di anti-tTG IgA (10 volte URL), la diagnosi può essere posta senza ricorrere alla biopsia.
- L'assenza di DQ2/DQ8 nei soggetti a rischio consente di escludere la celiachia e di evitarne il monitoraggio.

CONCLUSIONI

Il tema dell'appropriatezza in medicina di laboratorio, anziché concentrarsi su dibattiti teorici, deve entrare nella definizione di protocolli operativi, linee guida cliniche e percorsi diagnostico-terapeutici basati su solide prove scientifiche e di letteratura, che permettano di ridurre sprechi e ricorso a esami obsoleti o inutili. Le 3 aree diagnostiche prese in considerazione nel presente documento dimostrano 3 fatti essenziali: a) lo sviluppo, avvenuto nelle ultime decadi, di una nuova generazione di esami di laboratorio più accurati dal punto di vista clinico; b) la necessità di creare algoritmi diagnostici e

utilizzare i test riflessi per garantire qualità, sicurezza e appropriatezza all'informazione di laboratorio; e c) l'importanza di sviluppare e diffondere linee guida e protocolli che permettano di realizzare l'appropriatezza non solo nella richiesta, ma in tutte le fasi del ciclo dell'esame di laboratorio. Un insegnamento che proviene dalle esperienze sviluppate in vari ambiti internazionali evidenzia come l'appropriatezza non possa essere perseguita solamente per scopi economici e di riduzione dei costi, ma attraverso una serie di strategie che permettano di educare, formare e responsabilizzare i professionisti del sistema sanitario.

CONFLITTO DI INTERESSI

F. Ceriotti, F. Di Serio e M. Plebani dichiarano supporti per riunioni da Siemens Healthcare Italia.

BIBLIOGRAFIA

1. Giavarina D. L'appropriatezza in Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2015;39:209-16
2. Quaseem A, Alguire P, Dallas P, et al. Appropriate use of screening and diagnostic test to foster high-value, cost-conscious care. *Ann Intern Med* 2012;156:147-9
3. Mughal Z, Narayanan A, Gupta V, et al. Clinical need-directed blood tests: a step in saving the NHS? *Ann Clin Biochem* 2016;53:568-74.
4. Dorevitch AP. The "Ulysses syndrome" in pathology: when more is less. *Med J Aust* 1992;156:140
5. Zhi M, Ding EL, Theisen-Toupal J, et al. The landscape of inappropriate laboratory testing: a 15-year meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:1-7.
6. College of American Pathologists. Standards for Laboratory Accreditation. Northfield, Ill: College of American Pathologists; 1998.
7. Fryer AA, Smellie WS. Managing demand for laboratory tests: a laboratory toolkit. *J Clin Pathol* 2013;66:62-72.
8. Jackson BR. Managing laboratory test use: principles and tools. *Clin Lab Med* 2007;27:733-48.
9. Baird G. The laboratory test utilization management toolbox. *Biochem Med* 2014;24:223-34.
10. Rovner DR. Laboratory testing may not glitter like gold. *Med Decis Making* 1998;18:32-3.
11. Lippi G, Plebani M. False myths and legends in laboratory diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2087-97.
12. Lippi G, Cervellini G, Plebani M. The ten commandments of laboratory testing for emergency physicians. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:183-7.
13. Ionnidis JP. Biomarkers failures. *Clin Chem* 2013;59:202-4
14. Prochazka AV, Caverly T. General health checks in adults for reducing morbidity and mortality from disease: summary review of primary findings and conclusions. *JAMA* 2013;313:416-7.
15. Coulter A, Cleary PD. Patients' experiences with hospital care in five countries. *Health Aff* 2001;20:244-52.
16. Rolfe A, Burton C. Reassurance after diagnostic testing with a low pretest probability of serious disease: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2013;173:407-16.
17. Redberg R, Katz M, Grady D. Diagnostic tests: another frontier for less is more: or why talking to you patients is a safe and effective method of reassurance. *Arch Intern Med* 2011;171:619.
18. Solomon DH, Hideki H, Daltroy L, et al. Techniques to improve physicians' use of diagnostic tests. *JAMA* 1998;280:2020-7.
19. Sherwood P, Lyburn I, Brown S, et al. How are abnormal results for liver function tests dealt with in primary care? Audit of yield and impact. *Br Med J* 2001;322:277-8.
20. Gambino SR. Met and unmet needs of the automated clinical laboratory. *Trans N Y Acad Sci* 1970;32:816-20.
21. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981;45:1762-3.
22. 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.
23. Kobewska DM, Ronksley PE, McKay JA, et al. Influence of educational audit and feedback, system based, and incentive and penalty interventions to reduce laboratory test utilization: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:157-83.
24. Liu Z, Abdullah A, Baskin L, et al. An intervention to reduce laboratory utilization of referred-out tests. *Lab Med* 2012;43:164-7.
25. Feldman LS, Shihab HM, Thiemann D, et al. Impact of providing fee data on laboratory test ordering: a controlled clinical trial. *JAMA Intern Med* 2013;173:903-8.
26. Astion M, Shojanian KG, Hamill TR, et al. Classifying laboratory incident reports to identify problems that jeopardize patient safety. *Am J Clin Pathol* 2003;120:18-26.
27. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, et al. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines at the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Thyroid* 2011;21:593-646.
28. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Endocr Pract* 2012;18:988-1028.
29. Brenta G, Vaisman M, Sgarbi JA, et al. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013;57:265-98.
30. De Carvalho GA, Perez CLS, Ward LS. The clinical use of thyroid function tests. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013;57:193-204.
31. Caldwell G, Kellett GJ, Gow SM, et al. A new strategy for thyroid function testing. *Lancet* 1985;1:1117-9.
32. Squire CR, Fraser WD. Thyroid stimulating hormone measurement using a third generation immunometric assay. *Ann Clin Biochem* 1995;32:307-13.
33. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003;13:3-126.
34. Pearce EN. The relationship between serum TSH and free T4 is not log-linear and varies by age and sex. *Clin Thyroidol* 2013;25:156-7.
35. Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, et al. American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1573-5.
36. Muller AF, Berghout A, Wiersinga WM, et al. Thyroid function disorders – Guidelines of the Netherlands Association of Internal Medicine. *J Med* 2008; 66:134-42.
37. Nordyke RA, Reppun SR, Madanay LD, et al. Alternative sequences of thyrotropin and free thyroxine assays for routine thyroid function testing. *Arch Intern Med* 1998;158:266-72.
38. Wardle CA, Fraser WD, Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid function test. *Lancet* 2001;357:1013-4.
39. Beckett GJ, Toft AD. First-line thyroid function tests – TSH

- alone is not enough. *Clin Endocrinol* 2003;58:20-1.
40. Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and post-partum. *Thyroid* 2011;10:1081-125.
 41. Matyjasek-Matuszek B, Pyzik A, Nowakowski, et al. Diagnostic methods of TSH in thyroid screening tests. *Ann Agric Environ Med* 2013;20:731-5.
 42. Srivastava R, Bartlett WA, Kennedy IM, et al. Reflex and reflective testing: efficiency and effectiveness of adding on laboratory tests. *Ann Clin Biochem* 2010;47:223-7.
 43. Verboeket-van de Venne WPHG, Aakre KM, Watine J, et al. Reflective testing: adding value to laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1249-52.
 44. Penney MD, O'Sullivan DJ. Total or free thyroxine as a primary test of thyroid function. *Clin Chem* 1987;33:170-1.
 45. Klee GG, Hay ID. Assessment of sensitive thyrotropin assays for an expanded role in thyroid function testing: proposed criteria for analytic performance and clinical utility. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:461-71.
 46. Vieira AJ. Thyroid function testing in outpatients: are both sensitive thyrotropin (sTSH) and free thyroxine (FT4) necessary? *Fam Med* 2003;35:408-10.
 47. Stockigt J. Assessment of thyroid function: towards an integrated laboratory-clinical approach. *Clin Biochem Rev* 2003;24:109-22.
 48. Barbesino G, Tomer Y. The clinical use of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2247-55.
 49. Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N. Challenges in the standardization of autoantibody testing: A comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017;53:68-77.
 50. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, et al. Evaluation of the first autoamted immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves'disease. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:58-64.
 51. Zophel K, Wunderlich G, Kotzerke J. Should we really determine a reference population for the definition of thyroid-stimulating hormone reference interval? *Clin Chem* 2006;52:329-30.
 52. Goichot B, Sapin R, Schlienger JL. Subclinical hyperthyroidism: considerations in defining the lower limit of the thyrotropin reference interval. *Clin Chem* 2009;55:420-4.
 53. Baskin HJ, Cobin RH, Duick DS, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Pract* 2002;8:457-69.
 54. Hamilton TE, Davis S, Onstad L, et al. Thyrotropin levels in a population with no clinical, autoantibody, or ultrasonographic evidence of thyroid disease: implications for the diagnosis of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1224-30.
 55. Vieira JGH. Defining reference values for TSH: nearing perfection in an imperfect world. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010;54:589-90.
 56. Inal TC, Serteser M, Coskun A, et al. Indirect reference intervals estimated from hospitalized population for thyrotropin and free tyroxine. *Croat Med J* 2010;51:124-30.
 57. Surks MI, Boucai L. Age and race-based serum thyrotropin reference limits. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:496-502.
 58. Dorizzi R, Giannone G, Cambiaso P, et al. Indirect methods for TSH reference interval: at last fit for purpose? *Am J Clin Pathol* 2011;135:167-74.
 59. Gupta S, Verma M, Gupta AK, et al. Are we using thyroid function tests appropriately? *Ind J Clin Biochem* 2011;26:178-81.
 60. Vaidya B, Ekoumunne OC, Shuttleworth J, et al. Variability in thyroid function test requests across general practices in south-west England. *Qual Prim Care* 2013;213:143-8.
 61. Gurnell M, Halsall DJ, Chatterjee K. What should be done when thyroid function tests do not make sense? *Clin Endocrinol* 2011;74:673-8.
 62. Koulouri O, Moran C, Halsall D, et al. Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests. *Best Pract Clin Endocrinol Metab* 2013;27:745-62.
 63. Zaninotto M, Tognon C, Venturini R, et al. Interference in thyroid hormones with Roche immunoassays: an unfinished story. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:e269-70.
 64. Bolstad N, Warren DJ, Nustad K. Heterophilic antibody interference in immunometric assays. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:647-61.
 65. Rang M. The Ulysses syndrome. *Can Med Assoc J* 1972;106:122-3.
 66. Foraounzafar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385:117-71.
 67. Castro A, Coresh J. CKD surveillance using laboratory data from the population-based National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis* 2009;53:S46-55.
 68. De Nicola L, Donfrancesco C, Minutolo R, et al. Prevalence and cardiovascular risk profile of chronic kidney disease in Italy: results of the 2008-12 National Health Examination Survey. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:806-14.
 69. Lewey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO controversies conference report. *Kidney Int* 2011;80:17-28.
 70. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1-150.
 71. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet* 2012;380:807-14.
 72. Berger JR, Jaikaransingh V, Hedayati SS. End-stage kidney disease in the elderly: approach to dialysis initiation, choosing modality, and predicting outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis* 2016;23:36-43.
 73. Peralta CA, Estrella MM. Preventive nephrology in the era of "I" evidence: should we screen for chronic kidney disease? *Kidney Int* 2017;92:19-21.
 74. Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 2013;158:825-30.
 75. Agarwal R, Bills JE, Yigazu PM, et al. Assessment of iothalamate plasma clearance: duration of study affects quality of GFR. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:77-85.
 76. Schwartz GJ, Abraham AG, Furth SL, et al. Optimizing iothexol plasma disappearance curves to measure the glomerular filtration rate in children with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010;77:65-71.
 77. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
 78. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum

- creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Int Med* 1999;130:461-70.
79. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Int Med* 2009;150:604-12.
80. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:629-37.
81. Ceriotti F, Boyd JC, Klein G, et al. Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. *Clin Chem* 2008;54:559-66.
82. Infusino I, Panteghini M. Riferibilità metrologica e validità della determinazione della creatinina come indice di funzionalità renale. *Biochim Clin* 2007;31:13-8.
83. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, et al. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012;58:391-401.
84. Guder WG, Hoffmann GE, Hubbuch A, et al. Multicentre evaluation of an enzymatic method for creatinine determination using a sensitive colour reagent. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24:889-902.
85. Fossati P, Ponti M, Passoni G, et al. A step forward in enzymatic measurement of creatinine. *Clin Chem* 1994;40:130-7.
86. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:R31.
87. Mussap M, Graziani MS, Caldini A, et al. Documento di consenso SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) sulla richiesta di esami di laboratorio per la valutazione del danno renale da mezzi di contrasto. *Biochim Clin* 2014;38:140-1.
88. Roos JF, Doust J, Tett SE, et al. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children - a meta-analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383-91.
89. Zhang M, Cao X, Cai G, et al. Clinical evaluation of serum cystatin C and creatinine in patients with chronic kidney disease: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2013;41:944-55.
90. Li J, Dunn W, Breaud A, et al. Analytical performance of 4 automated assays for measurement of cystatin C. *Clin Chem* 2010;56:1336-9.
91. Grubb A, Blirup-Jehnsen S, Lindstrom V, et al. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1619-21.
92. Bargnoux AS, Piéroni L, Cristol JP, et al. Multicenter evaluation of cystatin C measurement after assay standardization. *Clin Chem* 2017;63:833-41.
93. Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BEP, et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1404-12.
94. Shlipak MG, Matsushita K, Arnlov J, et al. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med* 2013;369:932-43.
95. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinin ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA* 2011;305:1545-52.
96. Graziani MS, Secchiero S, Terreni A, et al. La diagnostica di laboratorio della malattia renale cronica in Italia: armonizzare è d'obbligo. *Biochim Clin* 2015;39:617-26.
97. Van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-52.
98. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, et al. Principali aspetti nella misurazione e refertazione della escrezione urinaria di albumina. *Biochim Clin* 2010;34:337-50.
99. Graziani MS, Plebani M. The standardization of the urine albumin assays: no longer deferrable. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1657-9.
100. Lieske JC et al. A reference system for urinary albumin: current status. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:981-9.
101. Ketha H, Singh RJ. Quantitation of albumin in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:31-6.
102. Bachmann LM, Nilsson G, Bruns DE, et al. State of the art for measurement of urine albumin: comparison of routine measurement procedures to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2014;60:471-80.
103. Leonard MM, Camhi S, Huedo-Medina TB, et al. Celiac disease genomic, environmental, microbiome, and metabolomics (CDGEMM) study design: approach to the future of personalized prevention of celiac disease. *Nutrients* 2015;7:9325-36.
104. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59(suppl 1):S7-9.
105. Porcelli B, Alessio MG, Villalta D, et al. Linee guida per la diagnosi di laboratorio e istologica della malattia celiaca. Revisione 2015. *Riv Ital Med Lab* 2015;11:76-95.
106. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine* 2012;10:13.
107. Villanacci V. The histological classification of biopsy in celiac disease: time for a change? *Dig Liver Dis* 2015;47:2-3.
108. Tonutti E, Bizzaro N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmun Rev* 2014;13:472-6.
109. Alessio MG, Tonutti E, Brusca I, et al. Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:44-9.
110. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, et al. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for the diagnosis of celiac disease. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2014;54:136-60.
111. Van der Windt DA, Jellema P, Mulder CJ, et al. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *JAMA* 2010;303:1738-46.
112. Lewis NR, Scott BB. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase compared as screening test for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:73-81.
113. Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:655-63.
114. Zintzaras E, Gemenis AE. Performance of antibodies against tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease: meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:187-92.
115. Li M, Liping Y, Tiberti C, et al. A report on the International Transglutaminase Autoantibody Workshop for Celiac Disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:154-63.
116. Rossi E, Basso D, Zamboni CF, et al. TNFA haplotype genetic testing improves HLA in estimating the risk of celiac disease in children. *PLoS One* 2015;10:e0123244.
117. Pallav K, Kabbani T, Tariq S, et al. Clinical utility of celiac disease-associated HLA testing. *Dig Dis Sci* 2014;59:2199-206.



FORMAZIONE A DISTANZA SIBioC PROVIDER



Nuovo corso FAD:

Biomarcatori in oncologia

Coordinatori: Massimo Gion, Chiara Trevisiol

10 crediti ECM

Altri corsi attivi:

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

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

15 crediti ECM

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

Coordinatore: Tommaso Trenti

15 crediti ECM

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

Coordinatori: Erica Rampoldi, Pietro Caironi

8 crediti ECM

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

Coordinatori: Mariastella Graziani, Cosimo Ottomano

10 crediti ECM

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

Coordinatore: Mariastella Graziani

8 crediti ECM

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



Consulta il
Catalogo editoriale...



Cosa c'è
di nuovo in Libreria?



SIBioC-Medicina di Laboratorio è su Facebook!

Seguici cliccando "MI PIACE" nella pagina

www.facebook.com/SIBioCmedicinadilaboratorio

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

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

QUALE CENTRO CONVEGNI A MILANO FA AL MIO CASO?

BioMedia Centro Convegni

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

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

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

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

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

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

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

I clienti possono inoltre richiedere i seguenti servizi aggiuntivi:

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

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

Silvia Terragni
Telefono: 02 45498282
E-mail: convegni@biomedia.net

49^o Congresso Nazionale SIBioC-Medicina di Laboratorio

Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

Save the date



Medicina di Laboratorio e Clinica: tra presente e futuro

Laboratory Medicine and Clinical Practice: from present to the future



FIRENZE
16-18 ottobre 2017

un evento
organizzato da



BIO MEDIA
La condivisione del sapere

www.congresso.sibioc.it