

Proposta di un algoritmo diagnostico per il deficit di Adenosina Deaminasi-2 (DADA2)

Alessia Cafaro¹, Alice Grossi², Sebastiano Barco¹, Federica Pigliasco¹, Margherita Biondi¹, Francesca Schena³, Federica Penco³, Sara Signa³, Enrico Drago⁴, Caterina Matucci-Cerinic⁴, Stefano Volpi³, Roberta Caorsi³, Roberto Bandettini¹, Isabella Ceccherini², Marco Gattorno³, Giuliana Cangemi¹

¹IRCCS Istituto Giannina Gaslini, U.O.C. Laboratorio Centrale di Analisi Settore Cromatografia e Spettrometria di Massa, Genova

²Genetica e Genomica delle Malattie Rare, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

³UOC Reumatologia e Malattie Autoinfiammatorie, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

⁴Dip. di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno infantili (DINOEMI), Università di Genova

Questo contributo è stato in parte presentato al WorldLab EuromedLab di Roma, 21-25 maggio 2023, sotto forma di abstract

ABSTRACT

Diagnostic workflow for Adenosine Deaminase-2 Deficiency (DADA2): a proposal

Deficiency of Adenosine deaminase 2 (DADA2) is a monogenic autoinflammatory disease caused by homozygous or compound heterozygous mutations in the *ADA2* gene (formerly *CECR1* Cat Eye Syndrome Chromosome Region 1). Clinical manifestations of DADA2 are highly variable and include systemic inflammation with fever, early stroke, vasculopathy, immune dysregulation (hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, increased rate of infections), and hematologic abnormalities (pure red cell aplasia, bone marrow failure, cytopenias). The most promising treatments are anti-TNF inhibitors, the only drugs that can prevent the serious consequences of the disease. Early diagnosis is therefore critical. DADA2 can be diagnosed by genetic analysis or functional tests (biochemical diagnosis) that allow the enzyme activity to be assayed. At the Giannina Gaslini Institute, a children's hospital in Italy, a method based on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry has been developed to measure enzyme activity. A diagnostic workflow is adopted at the institute that involves the assay of ADA2 activity followed by genetic confirmation when the biochemical test is altered.

Key words: deficit di adenosina deaminasi 2, test funzionale, attività enzimatica, analisi genetica

INTRODUZIONE

Il deficit di adenosina deaminasi 2 (DADA2) è una malattia autoinfiammatoria monogenica, causata da mutazioni nel gene *ADA2* (precedentemente *CECR1* Cat Eye Syndrome Chromosome Regione 1), sia in omozigosi sia in eterozigosi composta (OMIM: 607575) (1–3). L'adenosina deaminasi (ADA) è un enzima coinvolto nel metabolismo delle purine, catalizzando la conversione di adenosina in inosina e di 2'-deossadenosina in 2'-deossinosina. Esistono due isoforme di ADA: adenosina deaminasi 1 (ADA1) e adenosina deaminasi 2 (ADA2). La principale isoforma, ADA1, è responsabile della immunodeficienza combinata grave (Severe Combined Immune Deficiency, SCID) (4,5). I due isoenzimi hanno una parziale omologia strutturale, ma presentano alcune importanti differenze: l'affinità di ADA1 per l'adenosina e la deossadenosina

è circa 100 volte superiore a quella di ADA2; ADA1 è monomero e intracellulare, ADA2 è dimerico e viene secreto nell'ambiente extracellulare e, pertanto, è rilevabile nel plasma (4,5); ADA1 è espresso in modo ubiquitario in tutti i tipi di cellule, ADA2 è espresso prevalentemente nei monociti e in altre cellule della linea mieloide. L'eritro-9-amino- β -esil- α -metil-9H-purina-9-etanolo cloridrato (EHNA) è un inibitore selettivo di ADA1 (6).

Le manifestazioni cliniche di DADA2 variano ampiamente e includono infiammazione sistemica con febbre, ictus precoce e vasculopatia (6-12), disregolazione immunitaria (ipogammaglobulinemia, linfoproliferazione, aumento del tasso di infezioni) (3,11,13,14) e anomalie ematologiche (aplasia pura dei globuli rossi, insufficienza midollare, citopenie) (11,13,15,16). La malattia esordisce comunemente in età pediatrica, ma sono stati descritti anche casi con esordio in età adulta (10).

Corrispondenza a: Alessia Cafaro, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, U.O.C. Laboratorio Centrale di Analisi Settore Cromatografia e Spettrometria di Massa, Genova, Email; alessia.cafaro@gaslini.org

Ricevuto: 13.12.2023

Revisionato: 18.12.2023

Accettato: 15.01.2024

Publicato on-line: 02.02.2024

DOI: 10.19186/BC_2024.004

Il decorso clinico può essere cronico o caratterizzato da ricorrenti riacutizzazioni dell'infiammazione sistemica, durante le quali sono state descritte le manifestazioni cliniche più gravi (1).

Finora sono stati utilizzati diversi trattamenti nei pazienti con diagnosi di DADA2, inclusi steroidi, ciclofosfamide, azatioprina e metotrexato, ma i trattamenti più promettenti sono le terapie anti-TNF (etanercept, adalimumab e infliximab). Per massimizzare l'efficacia delle terapie con anti-TNF e prevenire le conseguenze gravi della patologia, il trattamento dovrebbe essere avviato al momento della diagnosi (1,10,17,18). Per questo motivo una diagnosi precoce è fondamentale per indirizzare il prima possibile i pazienti verso un trattamento efficace e per prevenire le gravi complicanze della malattia.

La diagnosi di DADA2 può essere effettuata tramite esami funzionali (diagnosi biochimica) che consentono la determinazione dell'attività enzimatica o tramite analisi genetiche. Gli esami funzionali confermano la mancanza o la riduzione dell'attività di ADA2 nei pazienti con sospetto clinico di DADA2 e rappresentano uno strumento rapido per supportare i clinici nell'avvio di un trattamento precoce con farmaci anti-TNF (4,10). Al momento solo pochi centri al mondo hanno a disposizione un esame per la determinazione enzimatica di ADA2 (4,6,10,18-20). Alcuni di essi per la quantificazione di adenosina e inosina utilizzano saggi spettrofotometrici (18,20) che soffrono di mancanza di specificità rispetto ai metodi cromatografici (21-24), richiedono molto tempo e presentano alcune limitazioni che ostacolano l'uso dell'esame per uno screening rapido dei pazienti (6,10,19,20).

Ben-Ami et al. (2016) hanno descritto un saggio, basato su cromatografia (6) liquida ad alte prestazioni (HPLC) con UV-VIS su dried plasma spot (DPS) (6) che è stato testato su cinque pazienti con diagnosi nota di DADA2, confermandone la riduzione di attività. Schnappauf et al. nel 2021 (20) hanno descritto un saggio spettrofotometrico per misurare l'attività di ADA2, quantificando sia l'inosina sia l'ipoxantina, che è stato cross-validato con un metodo HPLC. In un lavoro pubblicato nel 2021 da Ito et al. (19) è stato descritto un esame colorimetrico per la misura dell'attività enzimatica di ADA2 a partire da DPS, dispositivo di microcampionamento che consente una facile spedizione e conservazione. Tuttavia, questo metodo richiede un lungo tempo di incubazione, che rappresenta un ostacolo per una rapida diagnosi e per l'applicazione in un contesto di routine clinica (25). Presso l'Istituto Giannina Gaslini inizialmente è stato sviluppato un metodo per la misura enzimatica di ADA2 a partire da monociti circolanti, descritto da Caorsi et al. nel 2017 (10), che prevedeva la purificazione dei monociti da sangue periferico fresco, con tempi di incubazione molto lunghi (almeno 4 ore) a 37°C prima di poter valutare l'attività enzimatica. Il metodo ha consentito l'identificazione dei pazienti affetti da DADA2 rilevando l'attività di ADA2 nei surnatanti di coltura mediante analisi HPLC. Tuttavia, esso presentava alcune criticità in quanto erano necessari elevati volumi di sangue (10 mL), per effettuare l'analisi ed era richiesta la presenza fisica del paziente in Istituto, essendo

necessario il prelievo di sangue periferico a fresco per l'ottimale isolamento dei monociti.

La tecnologia cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) consente la quantificazione di piccole molecole, come l'inosina, con maggiore specificità, accuratezza e produttività rispetto ai metodi HPLC e gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) (21-24), potendo garantire maggiore specificità, accuratezza e produttività rispetto ai metodi HPLC e GC-MS (21-24). Tuttavia la strumentazione LC-MS/MS è molto costosa e richiede la presenza di personale altamente specializzato, pertanto è disponibile solo in pochi centri di terzo livello. La strumentazione LC-MS/MS è sufficientemente sensibile da consentire la determinazione di molti analiti a partire da microcampioni (25), dispositivi come i DPS, che rendono possibile la centralizzazione dei campioni presso centri altamente specializzati, poiché di solito presentano il vantaggio di una maggiore stabilità del campione, facilitando quindi la spedizione e garantendo costi più bassi e un minor rischio di danneggiamento del campione. Il DPS si ottiene aliquotando il plasma, ottenuto dopo centrifugazione di piccolissime quantità di sangue, su substrati classici di carta di cellulosa (25). L'utilizzo del DPS si presta particolarmente bene anche al caso della misura enzimatica di ADA2 (4).

Nel 2021 è stato quindi sviluppato un metodo per la misura dell'attività enzimatica a partire da DPS mediante LC-MS/MS (4). Il metodo prevede la determinazione diretta dell'inosina e l'attività viene espressa in nmoli prodotti per minuto (milliunità) per mL di plasma. L'uso della spettrometria di massa come metodo di rilevazione garantisce un'elevata specificità. L'attività enzimatica di ADA2 su DPS è risultata stabile, consentendo la conservazione del campione a temperatura ambiente e quindi facilitando la spedizione di campioni da altri centri.

L'analisi genetica del gene ADA2 può essere piuttosto laboriosa, poiché si trova nella regione cromosomica 22q11, instabile e soggetta a variazioni del numero di copie e ad altre alterazioni genomiche strutturali, varianti che a tutt'oggi sono di difficile identificazione (26). Pertanto, l'adozione di un esame biochimico funzionale come primo passo del processo diagnostico risulta preziosa per avviare tempestivamente una terapia appropriata, con la possibilità di confermare successivamente la diagnosi tramite l'analisi genetica.

ALGORITMO DIAGNOSTICO PRESSO L'ISTITUTO GIANNINA GASLINI

Metodo per la misura dell'attività enzimatica di ADA2

Lo sviluppo e la validazione del metodo LC-MS/MS per la diagnosi del deficit di ADA2 a partire da DPS sono stati già dettagliatamente illustrati nel lavoro del 2021 (4). Le molecole coinvolte nella determinazione dell'attività enzimatica di ADA2 sono tre: adenosina (substrato), inosina (prodotto) e EHNA (inibitore selettivo per ADA1). Il plasma è ottenuto a partire da sangue venoso periferico raccolto in provette contenenti

acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) tramite centrifugazione a 2 000 g per 5 minuti. Un'aliquota di 50 µL di plasma viene accuratamente applicata in duplicato su carta da filtro con una pipetta calibrata e fatta asciugare a temperatura ambiente (20-25°C) per 2 ore.

Da ciascun DPS, contenente circa 3 µL di plasma, vengono ricavati cinque dischetti da 3,2 mm di diametro, successivamente posizionati in provette Eppendorf da 1,5 ml, contenenti 50 µL di soluzione tampone con bicarbonato di ammonio 10 mM, EHNA 2 mM, acido formico 5,9 mM (pH 6,5). La reazione enzimatica viene condotta in un bagno termostatico a 37°C (temperatura corporea) mediante l'aggiunta di 5 µL di adenosina 22 mM per ottenere una concentrazione finale di adenosina 2 mM. Per ogni campione la reazione viene effettuata in doppio e bloccata rispettivamente dopo 5 e 10 minuti, con 40 µL di metanolo (MeOH) e 10 µL di acido formico al 10%, seguiti dall'aggiunta di 15 µL di ammonio bicarbonato di ammonio 1 M. Il campione viene centrifugato a 20000×g per 5 minuti a 4°C e l'eluato risultante è trasferito direttamente in fiale di vetro e iniettato nel sistema LC-MS/MS. L'attività enzimatica è generalmente determinata come prodotto (inosina) formato per unità di tempo. L'attività di ADA2 è espressa come mU/mL.

Le analisi sono eseguite utilizzando un TSQ Quantiva™ Triple Quadrupole accoppiato a un sistema Ultimate 3 000 UHPLC. I calibratori e i campioni controllo di qualità (QC) vengono preparati diluendo la soluzione di lavoro di inosina con l'appropriato volume di soluzione tampone (pH 6,5). La curva di calibrazione per la quantificazione dell'inosina è composta da 12 punti (19, 5, 39, 78, 156, 312, 625, 1 250, 2 500, 5 000, 10 000, 20 000 e 40 000 ng/mL). I quattro controlli di qualità [lower limit of quantification (LLOQ), QC basso, QC medio e QC alto] hanno le seguenti concentrazioni: 19,5, 58,5, 1 000 e 30 000 ng/mL. La linearità è stata valutata analizzando la curva di calibrazione tre volte in tre giorni non consecutivi. I criteri di accettazione per la variazione delle quantità degli standard ricalcolati sono ±15% del valore teorico (tranne ±20% per il LLOQ).

Per valutare l'imprecisione (CV%) del saggio enzimatico dell'ADA2, i campioni dei pazienti e dei controlli sono stati analizzati in triplicato. Gli esperimenti di imprecisione intra e inter-serie sono stati eseguiti su campioni ottenuti da donatori plausibilmente sani (n=16) misurando le repliche in 3 giorni consecutivi.

Il metodo è stato validato utilizzando campioni clinici provenienti da 18 pazienti con DADA2, 4 portatori sani e 44 soggetti sani di controllo. L'attività di ADA2, espressa come media (SD), era di 2,63 (1,7) mU/mL nei controlli sani; 0,02 (0,03) mU/mL nei pazienti DADA2 e 0,25 (0,18) mU/mL nei portatori sani. Il test di Mann-Whitney ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi. Più precisamente, pazienti con DADA2 rispetto ai portatori sani, p=0,0010; pazienti con DADA2 rispetto ai controlli sani, p<0,0010; portatori rispetto ai controlli sani, p=0,0012 (4).

La procedura è stata inserita tra gli esami eseguiti in regime di routine presso il Laboratorio Centrale di Analisi dell'Istituto a partire da settembre 2021. Da allora sono stati effettuati 320 esami. L'utilizzo del DPS, spedito a temperatura ambiente tramite posta ordinaria, ha consentito ad altri centri di inviare facilmente i campioni, offrendo ai pazienti l'accesso a questo esame che, al momento, a conoscenza degli autori, non è disponibile in altri contesti europei. Il risultato dell'esame biochimico è quindi dirimente, permettendo di indirizzare il campione con attività ridotta o assente all'indagine genetica.

Analisi genetica di ADA2

La Figura 1 riporta l'algoritmo delle indagini genetiche [Sanger Sequencing, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) e Whole Genome Sequencing (WGS)] che vengono effettuate in successione per confermare la causa dell'assenza di attività biochimica in tutti i casi che presentano un esame funzionale alterato.

La tecnica standard utilizzata per l'indagine genetica è il sequenziamento diretto tramite metodo Sanger dei 9 esoni codificanti il gene ADA2 e le porzioni introniche fiancheggianti coinvolte nello splicing. Seppur laborioso, secondo le linee guida, il metodo Sanger rimane la tecnica convenzionale per la convalida di un risultato genetico. Per la sua esecuzione si richiede in genere 1 µg di DNA, solitamente estratto da sangue intero. La tecnica permette di identificare varianti a singolo nucleotide o piccole inserzioni/delezioni, è per la maggior parte dei casi risolutiva ai fini della diagnosi genetica ed è anche utilizzata per stabilire la segregazione delle varianti nella famiglia e poter così offrire una consulenza genetica (Figura 2) (27).

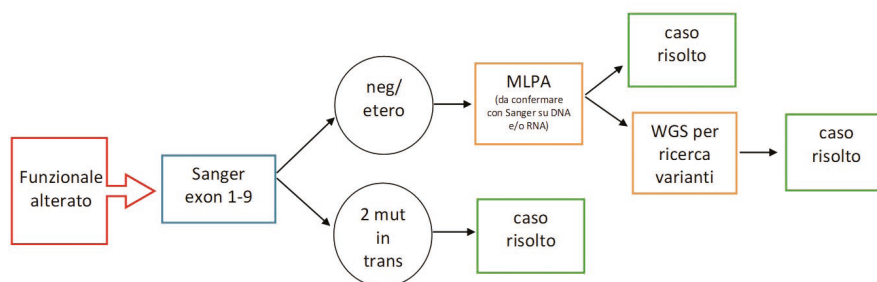


Figura 1

Algoritmo diagnostico per la diagnosi del deficit di ADA2.

MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, WGS, Whole genome Sequencing.

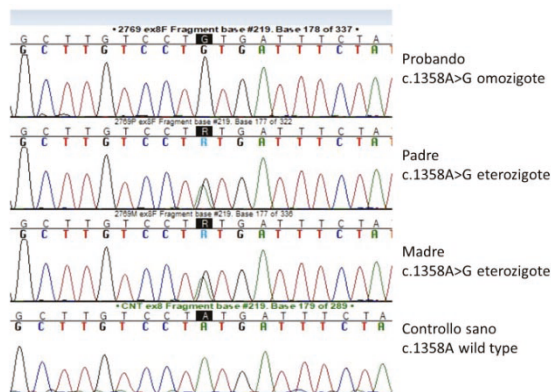


Figura 2
Esempio di una diagnosi genetica. Elettroferogrammi del sequenziamento Sanger effettuato su probando, padre, madre e controllo sano (dall'alto verso il basso). Evidenziato in nero il nucleotide oggetto del cambio patogenetico: in omozigosi nel probando, in eterozigosi nei genitori e wild type nel controllo sano di riferimento.

Come già riportato, il gene *ADA2* si trova in una regione cromosomica soggetta spesso a varianti strutturali: nei casi di attività enzimatica nulla, in totale assenza di mutazioni o in presenza di una sola di esse, si rende necessario verificare l'eventuale variazione nel numero di copie di DNA a tale *locus* (Copy Number Variants, CNVs). La tecnica gold standard a questo scopo è la MLPA: si tratta di un test semi-quantitativo che determina il numero di copie alleliche di uno specifico target rispetto a frammenti di riferimento. Un altro metodo per determinare CNVs è il Whole Genome Sequencing, il quale permette di individuare in maniera più dettagliata anche i breakpoints delle varianti strutturali, i quali sono generalmente a carico di regioni con alta omologia di sequenza (26).

CONCLUSIONI

Una diagnosi precoce risulta fondamentale per la gestione clinica dei pazienti con deficit di *ADA2*. La disponibilità di un esame funzionale rapido, robusto e affidabile per la misura dell'attività di *ADA2* è uno strumento fondamentale per indirizzare prima possibile i pazienti verso la conferma genetica e dunque verso la terapia più efficace. L'utilizzo del DPS è una strategia molto utile ai fini della centralizzazione di campioni da altri centri, poiché l'attività enzimatica *ADA2* su DPS risulta stabile a temperatura ambiente e quindi il campione può essere spedito tramite posta ordinaria.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Caorsi R, Penco F, Schena F, Gattorno M. Monogenic polyarteritis: the lesson of *ADA2* deficiency. *Pediatr Rheumatol Online J* 2016;14:51.
2. Lee PY, Kellner ES, Huang Y, Furutani E, Huang Z, Bainter W, et al. Genotype and functional correlates of disease phenotype in deficiency of adenosine deaminase 2 (*DADA2*). *J Allergy Clin Immunol* 2020;145:1664-72.e10.
3. Signa S, Bertoni A, Penco F, Caorsi R, Cafaro A, Cangemi G, et al. Adenosine Deaminase 2 Deficiency (*DADA2*): a crosstalk between innate and adaptive immunity. *Front Immunol* 2022;13:935957.
4. Cafaro A, Pigliasco F, Barco S, Penco F, Schena F, Caorsi R, et al. A novel LC – MS / MS-based method for the diagnosis of *ADA2* deficiency from dried plasma spot. *Molecules* 2021;26:5707.
5. Zavialov A V., Engström Å. Human *ADA2* belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* 2005;391:51-7.
6. Ben-Ami T, Revel-Vilk S, Brooks R, Shaag A, Hershfield MS, Kelly SJ, et al. Extending the clinical phenotype of adenosine deaminase 2 deficiency. *J Pediatr* 2016;177:316-20.
7. Nanthapaisal S, Murphy C, Omoyinmi E, Hong Y, Standing A, Berg S, et al. Deficiency of adenosine deaminase type 2: a description of phenotype and genotype in fifteen cases. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2314-22.
8. Pinto B, Deo P, Sharma S, Syal A, Sharma A. Expanding spectrum of *DADA2*: a review of phenotypes, genetics, pathogenesis and treatment. *Clin Rheumatol* 2021;40:3883-96.
9. Van Montfrans JM, Hartman EAR, Braun KPJ, Hennekam EAM, Hak EA, Nederkoorn PJ, et al. Phenotypic variability in patients with *ADA2* deficiency due to identical homozygous R169Q mutations. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55:902-10.
10. Caorsi R, Penco F, Grossi A, Insalaco A, Omenetti A, Alessio M, et al. *ADA2* deficiency (*DADA2*) as an unrecognised cause of early onset polyarteritis nodosa and stroke: a multicentre national study. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1648-56.
11. Batu ED, Karadag O, Taskiran EZ, Kalyoncu U, Aksentijevich I, Alikasifoglu M, et al. A Case Series of Adenosine Deaminase 2-deficient patients emphasizing treatment and genotype-phenotype correlations. *J Rheumatol* 2015;42:1532-4.
12. Dzhus M, Ehlers L, Wouters M, Jansen K, Schrijvers R, De Somer L, et al. A Narrative review of the neurological manifestations of human adenosine deaminase 2 Deficiency. *J Clin Immunol* 2023;43:1916-26.
13. Meyts I, Aksentijevich I. Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (*DADA2*): Updates on the Phenotype, Genetics, Pathogenesis, and Treatment. *J Clin Immunol*. 2018;38:569-578.
14. Trotta L, Martelius T, Siitonen T, Hautala T, Hämäläinen S, Juntti H, et al. *ADA2* deficiency: Clonal lymphoproliferation in a subset of patients. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:1534-7.e8.
15. Hashem H, Buccioli G, Ozen S, Unal S, Bozkaya IO, Akarsu N, et al. Hematopoietic cell transplantation cures Adenosine Deaminase 2 Deficiency: report on 30 patients. *J Clin Immunol* 2021;41:1633-47.
16. Schena F, Penco F, Volpi S, Pastorino C, Caorsi R, Kalli F, et al. Dysregulation in B-cell responses and T follicular helper cell function in *ADA2* deficiency patients. *Eur J Immunol* 2021;51:206-19.

17. Caorsi R, Omenetti A, Morreale A, Insalaco A, Buoncompagni A, Picco P, et al. Rapid and sustained effect of anti-TNF treatment in patients with ADA2 deficiency. *Pediatric Rheumatology* 2015;13 Suppl1:O80.
18. Ombrello AK, Qin J, Hoffmann PM, Kumar P, Stone D, Jones A, et al. Treatment Strategies for Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *N Engl J Med* 2019;380:1582-4.
19. Ito M, Nihira H, Izawa K, Yasumi T, Nishikomori R, Iwaki-Egawa S. Enzyme activity in dried blood spot as a diagnostic tool for adenosine deaminase 2 deficiency. *Anal Biochem* 2021;628: 114292.
20. Schnappauf O, Sampaio Moura N, Aksentijevich I, Stoffels M, Ombrello AK, Hoffmann P, et al. Sequence-based screening of patients with idiopathic polyarteritis nodosa, granulomatosis with polyangiitis, and microscopic polyangiitis for deleterious genetic variants in ADA2. *Arthritis Rheumatol* 2021;73:512-9.
21. Cafaro A, Pigliasco F, Baiardi G, Barco S, Stella M, Bandettini R, et al. Development and validation of a novel LC-MS/MS Method for a TDM-guided personalization of hsct conditioning with high-dose busulfan in children. *Biomedicines* 2023;11:530.
22. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for further developments. *Clin Biochem* 2008;41:649-62.
23. van der Gugten JG. Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. *Clinical Mass Spectrometry* 2020;15:36-43.
24. Leung KSY, Fong BMW. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? *Anal Bioanal Chem* 2014;406:2289-301.
25. Cafaro A, Conti M, Pigliasco F, Barco S, Bandettini R, Cangemi G. Biological fluid microsampling for therapeutic drug monitoring: a narrative review. *Biomedicines* 2023;11:1962.
26. Grossi A, Cusano R, Rusmini M, Penco F, Schena F, Podda RA, et al. ADA2 deficiency due to a novel structural variation in 22q11.1. *Clin Genet* 2019;95:732-3.
27. COMMISSIONE SIGU-NGS. Il sequenziamento del dna di nuova generazione: indicazioni per l'impiego clinico n.d. <https://sigu.net/?s=nuova+generazione> (ultimo accesso: gennaio 2024).