

Saggio CEDIA® per la rilevazione del metabolita dell'eroina 6-monoacetil morfina (6-AM)

Thermo
SCIENTIFIC

IVD Per uso diagnostico in vitro

Rx Only

REF 100107 (3 x 17 mL)
10015213 (3 x 17 mL Indiko Kit)
100108 (65 mL Kit)
100186 (495 mL Kit)

Uso previsto

Il saggio CEDIA® per la rilevazione del metabolita dell'eroina 6-monoacetil morfina (6-AM) è una metodologia immunoenzimatica in fase omogenea per la determinazione qualitativa e semiquantitativa in vitro del metabolita dell'eroina (6-AM) nell'urina umana ottenuta con analizzatori chimici clinici automatizzati. Le misurazioni sono utilizzate quale aiuto per l'identificazione dell'uso o dell'abuso di eroina (overdose).

Il saggio garantisce soltanto un risultato analitico preliminare. Utilizzare un metodo chimico alternativo più specifico a conferma del risultato analitico. La gas cromatografia o la spettrometria di massa (GC/MS) costituiscono il metodo di conferma d'elezione.¹ Avvalersi di considerazioni cliniche e del giudizio professionale per interpretare i risultati di qualsiasi test sull'uso o l'abuso di droghe soprattutto quando si utilizzano risultati positivi preliminari.

Riepilogo e presentazione del test

L'eroina (3,6-diacetilmorfina) viene prodotta per modificazione chimica della morfina, un alcaloide reperibile in natura nelle capsule immature del papavero da oppio (*Papaver somniferum*).^{2,3} L'eroina induce forte assuefazione ed è classificata come sostanza appartenente al gruppo I (per cui è bandito ogni uso farmacologico). L'eroina è il derivato dell'oppio di cui si fa maggiore abuso,^{4,5} e il suo uso è associato ad un'ampia gamma di problemi sanitari. Si somministra per endovena, con un'iniezione sottocutanea o si sniffa.³ Viene rapidamente metabolizzata (ha emivita di 9 minuti) in 6-AM dalle esterasi presenti nel sangue, quindi per idrolisi in morfina nel fegato.

La presenza di 6-AM nell'urina è considerata un marcatore specifico per l'uso illecito di eroina.^{6,8} Il 6-AM non si forma per acetilazione della morfina nell'organismo; la presenza perciò di 6-AM non può essere causata dall'iniezione di analgesici oppiacei legali o dall'assunzione di grosse quantità di semi di papavero da oppio. Per questo motivo, il Department of Health and Human Services, (DHHS, Ministero della sanità e dei servizi sociali) ha introdotto linee direttive aggiornate per i test sugli oppiacei che prevedono l'obbligo di test per il 6-AM per tutti i campioni di urina risultati positivi agli oppiacei per poter confermare l'abuso di eroina.⁹ L'emivita del 6-AM è di circa 35 minuti. Il tempo per cui la misurazione del 6-AM è indice diagnostico affidabile di uso di eroina dipende dal quantitativo di eroina assunto. È probabile che anche per dosi più elevate di eroina il tempo di rilevamento sia limitato alle 24 ore successive all'assunzione.⁴

Il saggio CEDIA per la rilevazione del metabolita dell'eroina utilizza la tecnologia del DNA ricombinante (brevetto USA N° 4708929) per produrre un sistema di immunodosaggio unico in fase omogenea.¹⁰ Il saggio si basa sull'enzima batterico β -galattosidasi, frazionato geneticamente in due frammenti inattivi chiamati Enzima accettore (EA) ed Enzima donatore (ED). I due frammenti si riassociano spontaneamente per formare un enzima interamente attivo che, nel formato del saggio, è in grado di scindere un substrato, dando così luogo ad una reazione colorimetrica misurabile mediante spettrofotometria.

Nel saggio CEDIA per la rilevazione del metabolita dell'eroina, il campione è in concorrenza con il 6-AM coniugato all'ED per i siti di legame dell'anticorpo. Se il 6-AM è presente nel campione, si lega all'anticorpo, lasciando il coniugato ED-6-AM libero di riassociarsi con l'EA per formare β -galattosidasi attiva. Se invece il campione non contiene 6-AM, l'anticorpo si lega al coniugato ED-6-AM, inibendo la riassociazione dei frammenti di β -galattosidasi inattivi e riducendo in tal modo la quantità di enzima attivo formato. L'ammontare dell'enzima attivo formato e il cambiamento di assorbanza risultante sono proporzionali alla quantità di 6-AM presente nel campione.

Reagenti

- 1 Tampone di ricostituzione EA:** contiene 0,32 mg/L di anticorpi monoclonali murini per 6-monoacetilmorfina, sali tampone, detergente e conservante.
- 1a Reagente EA:** contiene 0,171 g/L di enzima accettore, sali tampone, detergente e conservante.
- 2 Tampone di ricostituzione ED:** contiene sali tampone e il conservante.
- 2a Reagente ED:** contiene 16,2 μ g/L di enzima donatore coniugato con 6-monoacetilmorfina, 1,67 g/L di rosso di clorofenolo- β -D-galattopiranoside, uno stabilizzatore e un conservante.

Materiali aggiuntivi: etichette aggiuntive con codice a barre (N° cat. 100107 e 100108). Per le istruzioni per l'uso, consultare la documentazione dell'analizzatore per la specifica applicazione. Flaconi vuoti analizzatore per le soluzioni EA/ED (N° cat. 100108). Flaconi vuoti analizzatore per soluzioni ED (solo Cat. N° 1000186).

Materiali aggiuntivi occorrenti (venduti separatamente):

1557416	Calibratore negativo CEDIA, 5 mL
1661388	Calibratore negativo CEDIA, 10 mL
100031	Calibratore di cutoff CEDIA per metabolita dell'eroina (6-AM), 5 mL
100034	Calibratore alto CEDIA per metabolita dell'eroina (6-AM), 5 mL
100202	Set di controllo MGC Select, 3 x 5 mL

⚠️ Precauzioni e avvertenze

- Questo test è unicamente per uso diagnostico in vitro. I reagenti sono dannosi se ingeriti.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

PERICOLO: Il reagente in polvere contiene $\leq 55\%$ p/p di albumina sierica bovina (BSA) e $\leq 1\%$ p/p di Sodio azide. Il reagente liquido contiene $\leq 0,5\%$ p/p di siero bovino (FBS), $\leq 0,15\%$ di Sodio azide e $< 0,1\%$ di anticorpi farmaco-specifici (topo).
H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.
H334 - Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.
EUH032 - A contatto con acidi libera gas molto tossici.

Non respirare polveri, nubi, vapori e spray. Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. Indossare guanti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. In caso di ventilazione insufficiente utilizzare un apparecchio respiratorio. In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua e sapone. IN CASO DI INALAZIONE: se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente. Smaltire il prodotto/recipiente nelle apposite aree in conformità alla regolamentazione locale/regionale/nazionale/internazionale.

Preparazione e conservazione dei reagenti

Per la preparazione delle soluzioni da utilizzare con gli analizzatori Hitachi, vedere la sezione seguente. Per tutti gli altri analizzatori, fare riferimento alla documentazione dell'analizzatore per la specifica applicazione.

Estrarre il kit dal frigo subito prima della preparazione delle soluzioni.

Preparare le soluzioni nell'ordine seguente onde ridurre al minimo il rischio di contaminazione:

Soluzione dell'enzima donatore R2: collegare il flacone 2a (reagente ED) al flacone 2 (tampone di ricostituzione ED) utilizzando uno degli adattatori acclusi. Miscelare capovolgendo delicatamente, verificando che tutto il materiale liofilizzato del flacone 2a venga trasferito nel flacone 2. Evitare la formazione di schiuma. Staccare il flacone 2a e l'adattatore dal flacone 2 ed eliminare. Tappare il flacone 2 e lasciar riposare per circa 5 minuti a temperatura ambiente (15–25 °C). Miscelare di nuovo. Registrare la data di ricostituzione sull'etichetta del flacone.

Soluzione dell'enzima accettore R1: collegare il flacone 1a (reagente EA) al flacone 1 (Tampone di ricostituzione EA) utilizzando uno degli adattatori acclusi. Miscelare capovolgendo delicatamente, verificando che tutto il materiale liofilizzato del flacone 1a sia trasferito nel flacone 1. Evitare la formazione di schiuma. Staccare il flacone 1a e l'adattatore dal flacone 1 ed eliminare. Tappare il flacone 1 e lasciar riposare per circa 5 minuti a temperatura ambiente (15–25 °C). Miscelare di nuovo. Registrare la data di ricostituzione sull'etichetta del flacone.

N° cat. 100108-Analizzatore Hitachi 717, 911, 912 o 914: trasferire i reagenti ricostituiti nei flaconi vuoti corrispondenti R1 e R2 da 100 mL forniti con il kit. **Hitachi 917/sistema analitico P modulare:** utilizzare i reagenti ricostituiti senza trasferire il contenuto dei flaconi. Eliminare i flaconi da 100 mL vuoti.

N° cat. 100186-Analizzatore Hitachi 747/Sistema analitico modulare D: utilizzare l'imbuto fornito per trasferire una parte della soluzione R2 nel flacone vuoto della soluzione R2 fornito e correttamente etichettato.

NOTA 1: i componenti forniti nel kit sono da usare come un'unica unità. Non miscelare componenti provenienti da lotti differenti.

NOTA 2: evitare la contaminazione crociata dei reagenti verificando che i tappi reagente corrispondano al relativo flacone. La soluzione R2 deve essere di colore giallo-arancione. Una colorazione rosso scuro o rosso-porpora indica l'avvenuta contaminazione del reagente che deve pertanto essere eliminato.

NOTA 3: prima di condurre il saggio, le soluzioni R1 e R2 devono essere alla temperatura del comparto di conservazione del reagente dell'analizzatore. Per informazioni in merito, consultare la documentazione specifica dell'analizzatore.

NOTA 4: al fine di assicurare la stabilità della soluzione EA ricostituita, proteggere dall'esposizione continua e prolungata a luce intensa.

Conservare i reagenti a 2–8 °C. **NON CONGELARE.** Per la stabilità dei componenti non aperti, leggere la data di scadenza sulle etichette della confezione o del flacone.

Soluzione R1: 60 giorni refrigerata sull'analizzatore o a 2–8 °C.

Soluzione R2: 60 giorni refrigerata sull'analizzatore o a 2–8 °C.

Raccolta e preparazione del campione

Prelevare i campioni di urina in contenitori di plastica o vetro. Prestare attenzione a salvaguardare l'integrità chimica del campione di urina dal momento del prelievo fino all'esecuzione dell'analisi.

I campioni mantenuti a temperatura ambiente che non vengono inizialmente analizzati entro 7 giorni¹¹ dall'arrivo in laboratorio devono essere riposti in un'unità di refrigerazione sicura a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino a un massimo di due mesi.¹² La conservazione dei campioni di urina per periodi più lunghi prima o dopo l'analisi deve essere effettuata a una temperatura di -20 °C.^{12,13}

I laboratori che seguono le linee guida obbligatorie SAMHSA devono fare riferimento ai requisiti SAMHSA "Short-Term Refrigerated Storage" (Conservazione refrigerata a breve termine) e "Long-Term Storage" (Conservazione a lungo termine).⁹

Per proteggere l'integrità del campione, non indurre la formazione di schiuma ed evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti. Cercare di ottenere campioni pipettati senza detriti di grandi dimensioni. Si raccomanda di centrifugare i campioni notevolmente torbidi prima dell'analisi. I campioni congelati devono essere scongelati e miscelati prima dell'analisi. L'adulterazione del campione di urina può portare a risultati errati. Se si sospetta un'adulterazione del campione, prelevarne un altro e inoltrare entrambi i campioni al laboratorio per l'analisi.

Maneggiare tutti i campioni di urina come materiale potenzialmente infettivo.

Procedimento

Per l'esecuzione del saggio si possono usare analizzatori chimici in grado di mantenere una temperatura costante, pipettare i campioni, miscelare i reagenti e misurare i tassi enzimatici e i tempi di reazione con accuratezza. La documentazione relativa all'applicazione con i parametri specifici per lo strumento è reperibile presso Microgenics, appartenente al gruppo Thermo Fisher Scientific.

Controllo della qualità e calibrazione¹⁴

Analisi qualitativa

Per l'analisi dei campioni, utilizzare il calibratore di cutoff CEDIA per il metabolita dell'eroina (6-AM). Per tutti gli altri analizzatori, fare riferimento alla documentazione dell'analizzatore per la specifica applicazione.

Analisi semiquantitativa

Per l'analisi semiquantitativa dei campioni, utilizzare il calibratore negativo CEDIA e il calibratore di cutoff CEDIA per il metabolita dell'eroina per l'analisi dei risultati. Per tutti gli altri analizzatori, consultare il foglio applicativo relativo all'analizzatore in dotazione. Ripetere la calibrazione del test se i reagenti vengono sostituiti o se i risultati di controllo sono esterni ai limiti stabiliti.

La buona pratica di laboratorio raccomanda di eseguire i controlli lo stesso giorno in cui si saggiano i campioni dei pazienti ed ogni volta che si procede alla calibrazione. Si consiglia di eseguire due controlli: un controllo positivo e uno negativo. Basare la valutazione del controllo di qualità sui valori ottenuti nei controlli che devono ricadere entro limiti specifici. Se si rilevano tendenze o mutamenti subitanei dei valori, riesaminare tutti i parametri operativi. Rivolgersi al Servizio di assistenza tecnica alla clientela per ulteriore assistenza. Tutti i requisiti di controllo di qualità devono essere eseguiti in conformità con i regolamenti locali, regionali e/o statali o con i requisiti di accreditamento vigenti.

Risultati e valori attesi

Risultati qualitativi

Il calibratore di cutoff (10 ng/mL) CEDIA per il metabolita dell'eroina (6-AM) è utilizzato come riferimento per distinguere i campioni positivi da quelli negativi. I campioni che producono un valore di risposta uguale o superiore al valore della risposta del calibratore di cutoff sono considerati positivi. I campioni che producono una risposta di valore inferiore a quella del calibratore di cutoff sono considerati negativi. Per ulteriori informazioni in merito, consultare la documentazione specifica dell'analizzatore.

Risultati semiquantitativi

È possibile utilizzare il calibratore di cutoff CEDIA per metabolita dell'eroina (6-AM) insieme al calibratore negativo CEDIA DAU per stimare la concentrazione relativa di 6-monoacetil morfina. Per informazioni dettagliate, consultare il foglio applicativo relativo all'analizzatore in dotazione. Prestare attenzione nella refertazione dei risultati della concentrazione poiché esistono molti altri fattori che possono influenzare un test delle urine.

Limitazioni

1. Un risultato positivo del test indica la presenza di 6-AM; non indica però, né misura il grado d'intossicazione.
2. Vi è inoltre la possibilità che altre sostanze e/o fattori (ad es. errori tecnici o procedurali) possano interferire con il test causando falsi risultati.

Caratteristiche prestazionali specifiche

I risultati prestazionali tipici ottenuti sull'analizzatore Hitachi 717 sono riportati in basso.¹⁵ I risultati conseguiti nel proprio laboratorio potrebbero differire.

Precisione

Gli studi di precisione della misura, condotti utilizzando i reagenti, i calibratori e i controlli confezionati hanno dato luogo ai seguenti risultati espressi in mA/min con un analizzatore Hitachi 717 che aderiva al seguente esperimento NCCLS di repliche modificate (6 repliche due volte al giorno per 10 giorni).

Hitachi 717 qualitativo

Utilizzando il calibratore di cutoff di 10 ng/mL	Precisione intrasequenza		Precisione totale	
	Media ± SD (Standard deviation, Deviazione standard) (mA/min)	% CV	Media ± SD (mA/min)	% CV
Controllo basso (7,5 ng/mL)	437 ± 5,2	1,2	437 ± 6,4	1,5
Cutoff	467 ± 5,5	1,2	467 ± 8,0	1,7
Controllo alto (12,5 ng/mL)	494 ± 5,5	1,1	494 ± 8,3	1,7

Hitachi 717 semiquantitativo

Utilizzando il calibratore di cutoff di 10 ng/mL	Precisione intrasequenza		Precisione totale	
	Media ± SD (Standard deviation, Deviazione standard) (mA/min)	% CV	Media ± SD (mA/min)	% CV
Controllo basso (7,5 ng/mL)	7,6 ± 0,41	5,32	7,6 ± 0,49	6,41
Cutoff	9,9 ± 0,42	4,27	9,9 ± 0,53	5,32
Controllo alto (12,5 ng/mL)	12,0 ± 0,43	3,55	12,0 ± 0,54	4,49

Accuratezza

Sono stati saggiati 206 campioni di urina in totale con il saggio CEDIA per la rilevazione del metabolita dell'eroina (6-AM) sull'analizzatore Hitachi 717 utilizzando la gas cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) come riferimento. I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

GC/MS	Saggio CEDIA 6-AM su Hitachi	
	+	-
	+	189
-	0	46

*Il campione conteneva 10,7 ng/mL di 6-monoacetil morfina in base alla GC/MS.

Specificità

I seguenti precursori, metaboliti e composti strutturalmente correlati, se saggiati con il test CEDIA per la rilevazione del metabolita dell'eroina (6-AM), hanno dato luogo a risultati negativi per il calibratore di cutoff (10 ng/mL):

Composto	Concentrazione saggiata (ng/mL)
Codeina	500.000
Destrometorfano	100.000
Diidrocodaina	500.000
Eroina idrocloridrica (HCl)	80
Idrocodone	300.000
Idromorfone	10.000
Imipramina	200.000
Levorfanolo	10.000
Meperidina	800.000
Morfina	9.000
Morfina-3-glucuronide	600.000
Morfina-6-glucuronide	600.000
Nalorfina	7.000
Naloxone	300.000
Naltrexone	300.000
Norcodeina	600.000
Normorfina	30.000
Ossicodone	400.000
Ossimorfone	80.000

Alcuni composti strutturalmente non correlati sono stati saggiati con il test CEDIA per la rilevazione del metabolita dell'eroina (6-AM) ed hanno avuto esito negativo se saggiati alle concentrazioni sottelenate.

Composto	Concentrazione (ng/mL)	Composto	Concentrazione (ng/mL)
10, 11 di-idrocarbamazepina	85.000	Fenciclidina (PCP)	30.000
11-nor- Δ^8 -tetraidrocannabinolo (THC-COOH)	10.000	Fenobarbital	500.000
Acido acetilsalicilico	500.000	Fluoxetina	500.000
Acido salicilurico	500.000	Ibuprofene	500.000
Aloperidolo	100.000	Idroxicina	500.000
Amitriptilina	500.000	Levotiroxina	50.000
Amoxicillina	500.000	Metadone	500.000
Benzoilecgonina	100.000	Metanfetamina	500.000
Benzotropina metansolfonato	500.000	Nifedipina	500.000
Bromfeniramina	75.000	Nordiazepam	100.000
Caffeina	500.000	Oxazepam	250.000
Captopril	500.000	Paracetamolo	500.000
Cimetidina	500.000	Perfenazina	150.000
Clordiazepossido	100.000	Prociclidina	800.000
Clorpromazina	10.000	Propossifene	100.000
Desipramina	500.000	Protriptilina	200.000
Diazepam	100.000	Ranitidina	500.000
Difenidramina	50.000	Secobarbital	500.000
Digossina	100.000	Tripolidina	50.000
Doxepina HCl	100.000	Verapamil	500.000
Enalapril	500.000		

Interferenza

Non sono state osservate interferenze imputabili alle seguenti sostanze aggiunte alle concentrazioni endogene normali che di ritrovano nell'urina se saggiate con il saggio CEDIA per la rilevazione del metabolita dell'eroina (6-AM):

Sostanza	Concentrazione	Sostanza	Concentrazione
Acetone	≤ 1,0 g/dL	Etanolo	≤ 1,0 g/dL
Acido ascorbico	≤ 1,5 g/dL	Galattosio	≤ 10 mg/dL
Acido ossalico	≤ 0,1 g/dL	γ-globulina	≤ 0,5 g/dL
Albumina sierica umana	≤ 0,5 g/dL	Glucosio	≤ 1,0 g/dL
Cloruro di sodio	≤ 6,0 g/dL	Riboflavina	≤ 7,5 mg/dL
Creatinina	≤ 0,5 g/dL	Urea	≤ 2,0 g/dL
Emoglobina	≤ 0,3 mg/dL		

Bibliografia

1. Hawks RL. Analytical methodology. In: Hawks, RL, Chiang, CN, eds. Urine Testing for Drugs of Abuse. NIDA Research Monograph 1986: 73: 30-4.1
2. Balant LP, Balant-Gorgia AE. Opium and its derivatives. Clin. Ther. 1992; 14:846-848.
3. Baselt RC, Cravey RH. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 4th ed. Foster City, Calif.: Chemical Toxicology Institute; 1995.
4. Heroin: Abuse and Addiction. National Institute on Drug Abuse, Research Report Series, 1999; [http://www.nida.nih.gov:80/Research Reports/heroin/heroin2.html](http://www.nida.nih.gov:80/Research%20Reports/heroin/heroin2.html)
5. Mitchell JM, Paul BD, Welch P, Cone EJ. Forensic drug testing for opiates. II. Metabolism and excretion rate of morphine in humans after morphine administration. J. Anal. Toxicol. 1991; 15: 49-53.
6. Cone EJ, Welch P, Mitchell JM, Paul BD. Forensic drug testing for opiates. I. Detection of 6-Acetyl Morphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times. J. Anal. Toxicol. 1991; 15: 1-7.
7. Fuller DC, Anderson WH. A simplified procedure for the determination of free codeine, free morphine and 6-Acetyl Morphine in urine. J. Anal. Toxicol. 1992;16: 315-318.
8. Paul BD, Mitchell JM, Mell LD Jr., Irving I. Gas chromatography/electron impact mass fragmentometric determination of urinary 6-Acetylmorphine, a metabolite of heroin. J. Anal. Toxicol. 1989; 13 :2-7.
9. Department of Health and Human Services. Notice of Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs: Final guidelines. Fed. Register 1994; 110 (June 9):11983. (Revised guidelines expected in 2002).
10. Henderson DR, Friedman SB, Harris JD. et al. CEDIA™, a new homogeneous immunoassay system. Clin Chem. 1986; 32: 1637-1641.
11. Zaitso K, Miki A, Katagi M, Tsuchihashi H. Long-term stability of various drugs and metabolites in urine, and preventive measures against their decomposition with special attention to filtration sterilization. *Forensic Science Intl* 174 (2008) 189-196.
12. Gonzales E, Ng G, Pesce A, West C, West R, Mikel C, Llaatyshv, S, Almazan P. Stability of pain-related medications, metabolites and illicit substances in urine. *Clinica Chimica Acta* 416: (2013) 30-35.
13. C52-A2, Toxicology and Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Second Edition, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (April 2007).
14. Data on traceability are on file at Microgenics Corporation, a part of Thermo Fisher Scientific.
15. Data on file at Microgenics Corporation, a part of Thermo Fisher Scientific.

Glossario:

<http://www.thermofisher.com/symbols-glossary>



Microgenics Corporation,
part of Thermo Fisher Scientific
46500 Kato Road
Fremont, CA 94538 USA
Servizio di assistenza tecnica
e alla clientela USA:
1-800-232-3342



B-R-A-H-M-S GmbH
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, Germany



Per gli aggiornamenti del foglio illustrativo, visitare:
www.thermoscientific.com/diagnostics

Negli altri paesi:

Rivolgersi al rappresentante Thermo Fisher Scientific locale di fiducia.

CEDIA è un marchio depositato di Roche Diagnostics. Tutti gli altri marchi sono di proprietà di Thermo Fisher Scientific e delle sue affiliate.