

VOLUME 51
N. 1/2013



A.I.Pa.C.Me.M.
ASSOCIAZIONE ITALIANA
DI PATOLOGIA CLINICA
E MEDICINA MOLECOLARE

IL PATOLOGO CLINICO JOURNAL OF MOLECULAR AND CLINICAL PATHOLOGY

Componente WASPaLM



Direzione, Amministrazione e Redazione:

A.I.Pa.C.Me.M.

Via L. Ungarelli, 23 - 00162 Roma

Periodico

Poste Italiane S.p.A.

Spedizione in abbonamento postale

D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004 n. 46)

art. 1 comma 1 DCB - Roma

Registrazione al Tribunale Ordinario di Roma

Settore Civile - Sezione per la stampa e l'informazione

Parte cartacea n. 13410 del 24/06/1970

Parte telematica n. 125/2013 del 22/05/2013

QUOTE ASSOCIATIVE AIPACMeM 2013

Soci Ordinari (Medici, Biologi, Chimici e Laureati in Farmacia)

€ 60,00 (di cui 2,50 per spedizione Rivista in abbonamento postale)

Soci Aderenti (Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico)

€ 30,00 (di cui 2,50 per spedizione Rivista in abbonamento postale)

Soci Specializzandi e Non Strutturati

€ 30,00 (di cui 2,50 per spedizione Rivista in abbonamento postale)

Modalità di pagamento:

- **bollettino di c/c postale intestato ad:**

A.I.Pa.C.Me.M. - Via Luigi Ungarelli 23 - 00162 Roma - c/c n. 78632577

- **bonifico sul c/c intestato ad:**

A.I.Pa.C.Me.M. codice IBAN: IT90Q 05696 03201 000007920X17

IL PATOLOGO CLINICO JOURNAL OF MOLECULAR AND CLINICAL PATHOLOGY

Organo Ufficiale della Associazione Italiana di Patologia Clinica e Medicina Molecolare

Editor in Chief/Direttore Scientifico

Roberto Verna (RM)

Director/Direttore Responsabile

Roberto Verna (RM)

Editor/Redattore

Marina Vitillo (RM)

International Scientific Board/Comitato Scientifico Internazionale

Francesco Saverio Ambesi Impiombato (UD)

Sebastiano Andò (Rende - CS)

Jagdish Butany (Quebec - CA)

Massimiliano M. Corsi Romanelli (MI)

Francesco Curcio (UD)

Gaetano Danzi (CE)

Enrico De Simone (NA)

Eleftherios P. Diamandis (Toronto - CA)

Francesco Dieli (PA)

Javier Diez (Pamplona - E)

Ricardo P. Garay (Paris - F)

Anna Gasperi Campani (BO)

Alberto Gulino (RM)

Gamze Mocan Kuzey (Ankara - TR)

Michael Laposata (Nashville - USA)

Sebastiano La Rocca (RM)

Andrea Lenzi (RM)

Lai Men Looi (Kuala Lumpur - MY)

Alberto Mantovani (MI)

Marilene Melo (Sao Paulo - Brasil)

Bruno Moncharmont (CB)

Mikio Mori (Japan)

Claudio Napoli (NA)

Michael Oellerich (Gottingen - Germany)

Giuseppe Poli (TO)

Daniela Quaglino (MO)

Paul Raslavicus (Boston - USA)

Dario Roccatello (TO)

Luigi Massimino Sena (TO)

Vincenzo Sica (NA)

Henry Travers (Sioux Falls - USA)

CONSIGLIO DIRETTIVO

A.I.Pa.C.Me.M.

Presidente

Roberto Verna

Past President

Enrico De Simone

Vice Presidente Vicario

Gaetano Danzi

Segretario Nazionale

Tomaso Stampone

Tesoriere Nazionale

Gaetano Danzi

Rappresentante Nazionale Soci Aderenti

Maria Rosaria Andreozzi

Consiglieri

Giovanni Aloisio

Marina Cambi

Massimiliano Marco Corsi Romanelli

Rosarina Impera

Mariella Pallotta

Simonetta Morlunghi

Alessandro Porcu

Vittorio Sargentini

Esperta per i problemi professionali

Alessandra Di Tullio

Responsabile Nazionale

Qualità e Formazione

Vittorio Sargentini

Collegio dei Revisori dei Conti

Carla Lanzillotto

Mauro Martelli

Elena Vagnoni

Collegio dei Probiviri

Gelsomino De Vita

Antonio Picerno

Giuseppe Sciarra

Componente WASPaLM



*La presente pubblicazione
viene inviata gratuitamente
ai Soci A.I.Pa.C.Me.M.*

Associato all'USPI
Unione Stampa
Periodica Italiana



VOLUME 51 N. 1/2013

Direzione, Amministrazione e Redazione:

A.I.Pa.C.Me.M.

Via L. Ungarelli, 23 - 00162 Roma

Tel. (06) 8600007 - Fax (06) 8600042

internet: www.aipacmem.it

e-mail: segreteria@aipacmem.it

Fotocomposizione e stampa:

Poligrafica Laziale s.r.l.

00044 Frascati - P.le Sandro Pertini, 4

www.poligraficalaziale.it

IL PATOLOGO CLINICO JOURNAL OF MOLECULAR AND CLINICAL PATHOLOGY

INDICE

Pag.

- 3 **EDITORIALE**
VERNA R
- 4 **PROGRAMMA 63° CONGRESSO NAZIONALE A.I.Pa.C.Me.M.**
- 19 **RICORDO DEL PROF. GIOVANNI M. FERRI**
- 16 **MECCANISMI MOLECOLARI DELL'ASSOCIAZIONE HLA E MALATTIE AUTOIMMUNI**
BAROCCI S, ANTONELLI P, CRISTALLO A F
- 26 **MECCANISMI D'AZIONE ED EFFETTI DEGLI ANTICORPI ANTI-HLA SULLE CELLULE DEL TRAPIANTO DI ORGANI SOLIDI**
BAROCCI S, FONTANA I, CRISTALLO A F
- 32 **TURNAROUND TIME (TAT): EVOLUZIONE CLINICO GESTIONALE**
COSTA E, PAINI S, CORSI ROMANELLI M M
- 37 **IL VALORE PROGNOSTICO DELLA TROPONINA T IN PAZIENTI EMODIALIZZATI**
TRINCHESE G, FEDELE S, NAPOLITANO L A
- 40 **APPROCCI METODOLOGICI DI GOVERNANCE APPLICABILI ALLA PATOLOGIA CLINICA: IL BENCHMARK ED IL CONTROLLO DIREZIONALE.**
ANALISI DELLA SITUAZIONE ATTUALE E PROSPETTIVE FUTURE
VIBERTI G, MARTINETTO P, RUFFINO E D, RORATO L, CAMUSSO E, GIRAUDO P
- 54 **SEVERA EPATITE INDOTTA DAL PROPILTIOURACILE: UN CASO CLINICO**
TRINCHESE G, SCAFURO F, CALIENDO L, NAPOLITANO L A
- 63 **CHLAMYDIAL EYE INFECTIONS: FREQUENCY AND PATHOGENESIS IN PATIENTS ATTENDING AN EYE HOSPITAL**
GIARDINI F, LEONE F, GRANDI G, MACHETTA F, GRIGNOLO F M

EDITORIALE

PROF. ROBERTO VERNA

Carissimi,
siamo giunti ad un momento di fondamentale importanza per il futuro della nostra disciplina e, in particolare, per la nostra Associazione.

Il diffondersi della logica del risparmio a tutti i costi, infatti, penalizza oltremodo la professionalità degli operatori della diagnostica di laboratorio e, allo stesso tempo, limita fortemente la possibilità di agire compiutamente. Chiarisco subito ciò che intendo dire.

La tendenza sempre più marcata ad accentrare gli esami in mega (o giga) laboratori secondo il criterio delle cosiddette “aree vaste” genera forti problemi nel mantenimento della qualità, non solo per la preponderanza della “fase preanalitica” che, come sappiamo, è quella più soggetta ad errori ma, anche e soprattutto, per la forte riduzione delle possibilità di svolgere a regola d’arte la fase diagnostica. Un esempio? L’esame delle urine. Eseguito con cura e competenza (anche l’esame microscopico, quindi) offre grandi opportunità di diagnosi precoce e quindi di risparmio; se, invece, con la motivazione della mancanza di personale idoneo o di tempo, non viene approfondito, rischia di non avere utilità diagnostica e, meno che mai, preventiva, senza un reale risparmio. Quale può essere la soluzione? Come sempre, alle logiche di taglio economico indiscriminato bisogna rispondere con la cultura professionale, dimostrando che l’appropriatezza della richiesta e la qualità della risposta diagnostica determinano tali vantaggi per la salute da produrre anche vantaggi economici. Va fatto, inoltre, capire ai clinici che il dato di laboratorio ha un importante valore diagnostico se interpretato correttamente e non deve essere richiesto solo per necessità difensive o per “tradizione”. Ne sono prova i tanti esami richiesti in urgenza che non vengono poi presi in considerazione nel percorso terapeutico.

Tale situazione coinvolge doppiamente la nostra Associazione: da una parte la necessità di implementare l’impegno formativo verso i soci, in modo che possano avere ulteriori mezzi per ampliare la loro cultura diagnostica; dall’altro, la necessità di favorire l’interazione con tutti gli operatori del settore per aumentare le conoscenze, la propria consapevolezza e la massa critica per pervenire ad una maggiore forza contrattuale.

Tutto ciò è tutt’altro che facile. Serve impegno, tempo, e soldi. Sì, soldi; perché è necessario muoversi per partecipare a gruppi di lavoro e congressi, per implementare il sito web, per offrire ai soci la possibilità di accedere a riviste scientifiche, per organizzare corsi di formazione residenziale. Senza contare

che un’Associazione come la nostra ha l’assoluta necessità di una segreteria e di una sede, che hanno il loro costo. Molte volte è stata messa in discussione questa necessità, e soprattutto il suo costo; certo, tutto si può fare, ma credo che in questo momento la presenza di una sede sia aggregante verso i nostri soci e la presenza di una segreteria dedicata e competente sia un valore aggiunto irrinunciabile. Non credo che ogni socio abbia la completa percezione della quantità di lavoro che viene quotidianamente svolto per l’Associazione; temo anzi che molti credano che tutto vada avanti per inerzia, con grandi perdite di tempo. Non è così: i soci hanno le loro esigenze, i corsi vanno organizzati e seguiti, va fatto l’accreditamento ECM, va mantenuto l’accreditamento e la certificazione, attraverso relazioni agli enti preposti, la contabilità va curata, bisogna fare i versamenti in banca o alla posta per le varie incombenze, va curata la rivista, sollecitati i lavori scientifici, corrette le bozze, per non parlare del congresso nazionale. Direte, ma c’è una segreteria organizzativa! Sì, ma tutto comunque deve essere attentamente monitorato ed approvato e, comunque, tutta la parte scientifica viene seguita dall’Associazione, a partire dalla stesura del programma, alle lettere di invito, alla preparazione e correzione della stampa del programma e del volume degli atti, fino alle lettere di ringraziamento. Quest’anno è stata addirittura predisposta l’organizzazione alberghiera. Solo con un impegno costante e tanta dedizione si può realizzare quanto fin qui descritto.

Quest’anno c’è un problema aggiuntivo: la forte recessione economica, unita alla quantità di risorse assorbite dall’EuroMedLab ha ridotto ancor più i contributi delle Aziende, a livelli che definire bassi sarebbe eufemistico. Per fortuna, avendo previsto con grande anticipo il problema, siamo riusciti a mantenere i costi al minimo; è però assolutamente necessaria una massiccia partecipazione, sia per onorare il grande impegno scientifico ed organizzativo, sia per mostrare alle Aziende la nostra vitalità.

Infine, un cenno alla situazione intersocietaria: i rapporti tra AIPaCMeM, SIBioC, SIMeL, AMCLI, SIAPeC sono oscillanti: da una parte c’è grande coesione sulle tematiche di fondo e sul ruolo di FISMeLab che, sotto la presidenza di Pier Luigi Clerici, sta riprendendo un importante ruolo di coordinamento, che ha anche portato all’elezione del sottoscritto nel consiglio direttivo FISM. A tal proposito, vi ho informato tempo fa sulla decisione di estendere alle regioni il coordinamento FISMeLab per avere una

maggiore rappresentatività e forza contrattuale. Dall'altra, quando si accenna alla possibilità di svolgere insieme il congresso nazionale, cominciano i distinguo e le incomprensioni.

Per chi non fosse stato compiutamente informato, ritengo possa essere utile un breve riassunto degli eventi. Tre anni fa, ho proposto ai presidenti di SIBioC e SIMeL di iniziare a programmare un percorso comune, finalizzato alla confluenza delle attuali Società Scientifiche in una nuova realtà con un nuovo nome, perché non ci fossero né vinti né vincitori, ma solo Laboratoristi. La proposta è stata molto apprezzata dalle Aziende, ma non ha avuto seguito. Nel 2011, SIBioC e SIMeL hanno svolto il congresso insieme, ma nessuno dei due è rimasto soddisfatto. Nel 2012, visto che avevamo programmato il congresso nazionale ad Udine insieme ai Patologi Generali, proposi a SIMeL di farlo insieme, ma non se ne fece nulla perché SIMeL era impegnata nel rinnovo del direttivo nazionale. SIBioC decise di fare il congresso da sola a Roma. Per il 2013, proposi Perugia e SIMeL propose Torino, senza che si giungesse ad un accordo. SIBioC è coinvolta in EuroMedLab e non farà il nazionale quest'anno, ma solo un interregionale. Avendo avuto già nel 2012 la disponibilità della SIPMeT a rifare il congresso insieme nel 2014, questa volta a Palermo, invitai gli altri presidenti a prendere in considerazione la possibilità di un grande evento comune, ma non trovai molto entusiasmo. Circa due mesi fa, è arrivata una comunicazione del presidente SIMeL, indirizzata al presidente SIBioC ed al sottoscritto, e per conoscenza al presidente di AssoDiagnostici, per informarci che il direttivo SIMeL proponeva di fare il congresso nazionale insieme nel 2014 e aveva prenotato il pala congressi di Rimini. SIBioC ha risposto che avrebbe portato la

proposta al direttivo e, successivamente, ha informato che il direttivo preferiva fare un congresso autonomo, non avendolo potuto fare quest'anno per via di EuroMedLab. Io ho risposto invitando il presidente SIMeL ad illustrare la proposta al nostro direttivo convocato per il 28 maggio. Il presidente SIMeL ha replicato che non è necessaria la sua presenza perché avrei potuto ben illustrare io la proposta. Ma se non c'è una proposta! Fare un congresso insieme non vuol dire solo andare a cena. Bisogna integrare un programma scientifico, definire i relatori, gli invitati, la ripartizione dei costi e degli eventuali utili. Siamo perciò ancora in alto mare per quanto riguarda percorsi comuni. So che i quasi tutti i membri di tutte le società scientifiche vorrebbero procedere verso l'unificazione, e lo vorrei anch'io, ma il risultato ancora non si riesce ad ottenere. A mio parere, le resistenze sono dovute in parte alla diversa connotazione scientifica delle varie società, ma anche alla diversa rappresentatività e numerosità, che genera differenti apprezzamenti e sponsorizzazioni da parte delle Aziende. Solo cercando di uniformare, o perlomeno avvicinare, questi aspetti, si potrà ottenere il risultato che tutti auspichiamo.

Per questo, vi invito a partecipare con maggiore presenza e intensità alla vita dell'associazione, alla rivista, alle attività scientifiche ed ai congressi, in modo da testimoniare il senso di appartenenza e favorire il processo di integrazione.

Vi aspetto quindi numerosi a Perugia, per un nuovo, importante successo.

Prof. Roberto Verna
Presidente Nazionale
AIPaCMem

63° CONGRESSO NAZIONALE AIPaCMeM

Innovazione, conoscenza e integrazione
nella medicina di laboratorio



PERUGIA 2013

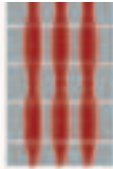
16/18 SETTEMBRE

Programma preliminare



Associazione Italiana
di Patologia Clinica e
Medicina Molecolare
A.I.P.a.C.Me.M.

CON IL PATROCINIO DI:



Regione Umbria



Provincia di Perugia



Comune di Perugia



Carissimi,

è con grande piacere che, anche a nome del Consiglio Direttivo dell'AIPaCMeM, del Coordinatore della Commissione Scientifica Prof. Massimiliano Marco Corsi Romanelli, e del Presidente del Comitato Organizzatore Locale Dott.ssa Simonetta Morlunghi, vi invito a partecipare attivamente al 63° Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Clinica e Medicina Molecolare che si svolgerà a Perugia dal 16 al 18 settembre 2013. Il Congresso si terrà per la prima volta nella storia della nostra Società a Perugia, città di grandi tradizioni artistiche e culturali e patria di una Università che, nel corso degli anni, ha raggiunto qualità e dimensioni di primaria importanza, grazie anche ad un ospedale universitario di alto livello. La scelta di questa sede vuole essere perciò un riconoscimento all'eccellenza della Scuola Medica perugina ma anche all'impegno profuso in questi anni dalla Dottoressa Morlunghi, Presidente della Sezione Regionale Umbria, che ha saputo portare il numero dei Soci della Regione da poche unità ad oltre un centinaio. Le vaste competenze scientifiche sia di laboratorio che cliniche della realtà perugina verranno ampiamente rappresentate nelle sessioni scientifiche, alcune delle quali verranno svolte in collaborazione con Società Scientifiche Cliniche con la finalità di definire percorsi diagnostici sempre più condivisi tra gli operatori di una moderna Sanità. Il programma, di alto profilo sia dal punto di vista educativo che scientifico, prevede Simposi e Sessioni interattive, che interesseranno tutti i settori della Patologia Clinica e della Medicina di Laboratorio. Di particolare rilevanza è la sessione della prima giornata, che precederà la seduta inaugurale, dedicata ai problemi medico legali ed alla responsabilità in laboratorio. È questo un tema di grande attualità, perché sempre più spesso i professionisti della sanità vengono coinvolti in problematiche legali con la conseguenza di aumentare a dismisura gli atti diagnostici attuando la cosiddetta medicina difensiva che tanto pesa sulle risorse economiche del sistema sanitario. Il dibattito sulla necessità di un'appropriatezza diagnostico-clinica, con la formulazione di linee guida adeguate alle differenti realtà sanitarie ma condivise fra tutte le componenti della sanità, potrà certamente aiutare a dirimere una questione non facile ma assolutamente necessaria da affrontare.

Il Consiglio Direttivo desidera promuovere la partecipazione di Specializzandi, Dottorandi di Ricerca, giovani Specialisti e Tecnici Sanitari di Laboratorio, istituendo quote di iscrizione particolarmente contenute, specie per i residenti nella Regione Umbria. Quale segreteria organizzativa, quest'anno è stata scelta la FASI, che sarà a vostra disposizione per tutte le vostre esigenze. Desidero, peraltro, ricordarvi che la nostra Associazione ha deciso di proseguire sulla linea tracciata chiedendo a tutti i soci, a partire dal Presidente Nazionale, di provvedere personalmente (anche mediante sponsor esterni) alla quota di iscrizione ed ai trasferimenti. A differenza di quanto concesso in passato, quindi, ai membri del consiglio direttivo ed ai presidenti regionali viene offerta solo l'ospitalità alberghiera per due notti. Ai relatori che sono nostri soci, verrà chiesto di provvedere comunque alla quota di iscrizione in modo da poter seguire l'intero congresso. Tale dolorosa decisione si è resa necessaria per poter fronteggiare l'emergenza economica che ha investito tutti, adeguarsi alla spending review, e poter svolgere l'evento anche in un momento economicamente difficile. Sono convinto che tale decisione sarà apprezzata anche dalle Aziende, nostre partners, e dalle Istituzioni; è importante che sia chiaro che i contributi che otterremo saranno destinati a produrre un evento di elevato significato scientifico, senza sprechi. La speranza è che, coinvolgendo tutti i soci in un impegno personale a favore del Congresso, si possa accelerare l'uscita da quell'inerzia che, negli ultimi tempi, aveva fortemente danneggiato l'Associazione. Confido che tutti i soci, da quelli di vecchia data a quelli più recenti, vogliano comprendere e condividere le nostre scelte. La data limite per la sottomissione degli abstracts congressuali è il 3 Giugno 2013. Vi prego di rispettare tale deadline per consentire la logistica di pre-presentazione più adatta. Infine, credo sia superfluo ricordare le attrattive culturali e paesaggistiche pre-senti non solo a Perugia, ma in tutta l'Umbria; l'occasione di ampliare il soggiorno in questo splendido contesto potrebbe essere uno stimolo in più per non mancare. In attesa di incontrarvi numerosi a Perugia il prossimo 16-18 settembre, vi invio i miei più cari saluti.

Prof. Roberto Verna
Ordinario di Patologia Clinica Sapienza Università di Roma
Presidente Nazionale AIPaCMeM

PROGRAMMA DEL CONGRESSO

LUNEDÌ 16 SETTEMBRE

- 10.00-14.00 **Corso di Formazione in Ematologia**
Responsabile
[Simonetta Morlunghi \(PG\)](#)
- 10.00-14.00 **Corso di Formazione in Infertilità maschile e diagnosi di laboratorio**
Responsabile
[Roberto Biondi \(PG\)](#)
- 11.30-15.00 **Riunione Consiglio Direttivo Nazionale AIPaCMeM**
- 15.30-18.30 **Sessione di aggiornamento professionale**
Problemi medico-legali e responsabilità nel laboratorio: l'appropriatezza diagnostica e la valutazione da parte dei pazienti
Sessione in comune con FISM e FISMeLab
Moderatori
[Roberto Verna \(RM\)](#), [Giampaolo Fiorio \(PG\)](#)
- Interventi preordinati**
- La responsabilità medica**
[Franco Vimercati](#) - Presidente FISM (MI)
[Giuliano Mignini](#) - Sostituto Procuratore (PG)
- La responsabilità in laboratorio vista dalle Società Scientifiche**
[Pierangelo Clerici](#) - Presidente FISMeLab e AMCLI (MI)
[Giuseppe Castaldo](#) - Presidente SIBioC (NA)
[Bruno Biasioli](#) - Presidente SIMeL (TS)
[Claudio Clemente](#) - Presidente SIAPeC IAP (MI)

L'appropriatezza diagnostica per il risparmio sanitario

Sebastiano La Rocca (RM)

Marina Vitillo (RM)

Giuseppina Viberti (TO)

Walter Orlandi (PG)

Giuseppe Petrazzini - Sostituto Procuratore (PG)

Giuseppe Legato (PG)

Come i pazienti percepiscono il ruolo del laboratorio e come lo valutano

Interventi dell' Associazione Pazienti

Carla Mariotti (PG) - Responsabile Regionale del Tribunale per i diritti del malato Cittadinanzattiva Umbria

Conclusioni

Giacomo Fumu - Procuratore della Repubblica Perugia (PG)

Mauro Bacci - Ordinario di Medicina Legale (PG)

Discussione Generale

18.30 **Trasferimento al centro di Perugia per la Cerimonia Inaugurale**

19.00 **Abbazia di San Pietro: Cerimonia inaugurale - Invitati:**

Francesco Bistoni

Magnifico Rettore Università di Perugia

Luigi Frati

Magnifico Rettore Sapienza Università di Roma
e Presidente SIPMeT

Andrea Lenzi

Presidente Consiglio Universitario Nazionale

Francesco Pennacchi

Preside Facoltà di Agraria, Perugia

Luciano Binaglia

Preside Facoltà di Medicina, Perugia

Catiuscia Marini

Presidente Regione Umbria

Franco Tomassoni

Assessore alla Sanità Regione Umbria

Marco Vinicio Guasticchi

Presidente Provincia di Perugia

Wladimiro Boccali

Sindaco di Perugia

Lorena Pesaresi

Assessore alle Politiche Energetiche e Ambiente

Comune di Perugia

Gabriella Guasticchi

Direttore Generale Laziosanità - ASP

Walter Orlandi

Direttore Generale Azienda Ospedaliera di Perugia

Giuseppe Ambrosio

Direttore Sanitario Azienda Ospedaliera di Perugia

Giuseppe Legato

Direttore Generale ASL Umbria 1

Diamante Pacchiarini

Direttore Sanitario ASL Umbria 1

Pasquale Mosella

Presidente Assodiagnostici (MI)

Lettura Magistrale

Cioccolato: piacere e non solo...

Roberto Verna (RM)

20.15 **Cocktail inaugurale**

MARTEDÌ 17 SETTEMBRE

- 08.30-11.15 **Sessione scientifica**
Malattie Endocrino-Metaboliche
Sessione in collaborazione con la Società Italiana di Medicina Interna (SIMI)
Moderatori
Milvia Lotzniker (MI), Gianpiero Benetti (MI)
- 09.00 **Dislipidemie**
Elmo Mannarino (PG)
- 09.20 **Laboratorio delle malattie endocrine**
Marco Caputo (VR)
- 09.40 **L'analisi delle urine nella nefropatia diabetica**
Fabio Manoni (PD)
- 10.00 **Iperuricemie e sindrome metabolica**
Francesco Perticone (CZ)
- 10.20 **La medicina di laboratorio nelle endocrinopatie dell'adolescenza**
Maurizio d'Amora (NA)
- 10.40 **Il Laboratorio nella Medicina di Genere**
Simone Baldovino (TO)
- 11.00 **Discussione e conclusioni**
- 11.15 **Coffee Break**
- 11.45-13.15 **Sessione scientifica**
Reumatologia e Immunologia Clinica
Sessione in collaborazione con la Società Italiana di Reumatologia e con la Società Italiana dell'Osteoporosi del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro
Moderatori
Giovanni Grande (NA)
Massimiliano Marco Corsi Romanelli (MI)

- 11.45 **La Medicina di Laboratorio Integra l'Osservazione Clinica Reumatologica**
Giovanni Minisola (RM)
- 12.05 **La Valutazione Biochimica dell'Osteoporosi**
Salvatore Minisola (RM)
- 12.25 **Il laboratorio nelle Malattie Autoimmuni Sistemiche**
Loredana Postiglione (NA)
- 12.45 **La diagnostica molecolare nelle patologie immunitarie: l'esempio delle allergie alimentari**
Vittorio Sargentini (RM)
- 13.05 **Discussione e conclusioni**
- 13.15-14.15 **Lunch**
- 12.00-15.00 **Riunione del Consiglio Direttivo della Federazione Italiana delle Società Medico Scientifiche – FISM**
- 14.15-16.00 **Workshops**
- 16.00-17.00 **Sessione scientifica**
Ambiente e Salute
Moderatori
Alessandro Marocchi (MI)
Francesco Pennacchi (PG)
Lorena Pesaresi (PG)
- 16.00 **35 anni di studi dopo l'incidente di Seveso: quali effetti della diossina sull'uomo**
Paolo Mocarrelli (MI)
- 16.30 **La conversione energetica delle biomasse**
Franco Cotana (PG)
- 16.00-18.30 **Sessione Speciale per i Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico**
- 16.00 **Studio dell'attivazione dell'emostasi con metodi globali: loro applicazioni in clinica**
Claudia Papi (FI)

- 16.50 **L'importanza del controllo di qualità C.Q.I e della partecipazione a programmi VEQ per la gestione della qualità analitica**
Maria Rosaria Andreozzi (RM)
- 17.30 **Tecniche di istocompatibilità nel trapianto di organo**
Claudia Ceccarelli (FI)
- 18.10 **La gestione remota del POCT: opportunità presenti e future**
Maria Rosaria Andreozzi (RM)
- 17.00-18.30 **WASPaLM Session (in english)**
New perspectives for the early diagnosis and laboratory monitoring
Chairmen
Francesco Curcio (UD)
Calogero Caruso (PA)
Giuseppe Friscia (AG)
- 17.00 **Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs – state of the art and options for biomarkers**
Michael Oellerich (D)
- 17.20 **Tumor immunology**
Francesco Dieli (PA)
- 17.40 **Cytologic approach for the Diagnosis of Squamous Epithelial Cell Abnormalities**
Gamze Mocan Kuzey (TR)
- 18.00 **Potential clinical utility of telomerase in cancer assessment**
Lai Meng Looi (MAL)
- 18.20 **Discussion**
- 17.00-19.30 **Comunicazioni e Poster**
Moderatori
Michele Cioffi (NA)
Mariella Pallotta (AP)
- 19.00–20.00 **Assemblea Nazionale dei Soci**
- 20.30 **Cena di gala e premiazioni**

MERCOLEDÌ 18 SETTEMBRE

- 09.00-10.15 **Sessione scientifica Infettivologia**
Moderatori
Francesco Bistoni (PG)
Antonio De Santis (BA)
Tomaso Stampone (PA)
- 09.00 **Integrazione fra sierologia e biologia molecolare nella diagnosi delle infezioni da cytomegalovirus e Toxoplasma gondii in gravidanza**
Alessandra Sensini (PG)
- 09.20 **Vaccini Universali**
Antonio Cassone (PG)
- 09.40 **Le Resistenze Batteriche in Ospedale: "Hot Points" d'attualità**
Gerardino Amato (NA)
- 10.00 **Discussione**
- 10.15-10.30 **Coffee break**
- 10.30-11.45 **Sessione scientifica Ematologia**
Moderatori
Carla Lanzillotto (LE)
Silvio Canino (PG)
- 10.30 **Basi molecolari della leucemia acuta mieloide a cariotipo normale**
Brunangelo Falini (PG)
- 10.50 **Tecniche di manipolazioni delle cellule staminali ematopoietiche**
Franco Aversa (PG/PR)
- 11.10 **Interrelazione fra Ematologia di base ed Ematologia specialistica**
Paolo Danise (NA)
- 11.30 **Discussione**
- 12.15 **Chiusura Congresso ed illustrazione del Congresso di Palermo 2014**
Roberto Verna, Massimiliano Marco Corsi Romanelli, Gaetano Danzi, Tomaso Stampone, Giuseppe Friscia

INFORMAZIONI GENERALI

Sede Congressuale

Hotel Giò
Via Ruggero D'andreatto, 19 - Perugia
tel/fax: +39 075 5731100

Come raggiungere la sede

L'Hotel Giò Wine e Jazz Area si trova a Perugia in Via Ruggero d'Andreotto, 19 non lontano dall'uscita Perugia San Faustino della E45. Vicino alla Stazione Ferroviaria, dista circa 800 metri dal Centro Storico che è raggiungibile a piedi se si ama camminare anche in salita, altrimenti è possibile servirsi del Minimetrol a 200 metri o il bus di linea di fronte all'Hotel.

Come raggiungere Perugia

In automobile

DA NORD: Autostrada A1, uscita di Valdichiana e raccordo per Perugia costeggiando il lago Trasimeno

DA SUD: Autostrada A1, uscita di Orte, raccordo Orte-Terni, uscita per Perugia per l'immissione nella E45

DA NORD-EST: Superstrada E45 (Cesena - Orte) uscite di Perugia

In treno

DA NORD: linee ferroviarie

- "Milano-Bologna-Firenze-Roma" cambio a Terontola
- "Firenze-Terni"

DA SUD: linee ferroviarie

- "Roma-Ancona" cambio a Foligno
- "Roma-Firenze-Bologna-Milano" cambio a Terontola.

In aereo

AEROPORTO INTERNAZIONALE DELL'UMBRIA - PERUGIA
"SAN FRANCESCO D'ASSISI"

- voli giornalieri da e verso Milano Malpensa
- voli stagionali nazionali e internazionali
- voli internazionali con scalo a Milano Malpensa

Iscrizioni:

	entro il 30 maggio	dopo il 30 maggio
Soci Ordinari	€ 330,00+IVA 21%	€ 430,00+IVA 21%
Non Soci	€ 390,00+IVA 21%	€ 510,00+IVA 21%
Tecnici Soci	€ 230,00+IVA 21%	€ 300,00+IVA 21%
Tecnici non Soci	€ 290,00+IVA 21%	€ 380,00+IVA 21%
Non Strutturati Soci*	€ 130,00+IVA 21%	€ 170,00+IVA 21%
Non Strutturati non Soci*	€ 210,00+IVA 21%	€ 275,00+IVA 21%
Accompagnatori**	€ 150,00+IVA 21%	€ 195,00+IVA 21%

La quota comprende: accesso sessioni scientifiche, kit congressuale, welcome cocktail, coffee breaks, lunch, cena di gala, attestato di partecipazione.

* La quota comprende: accesso sessioni scientifiche, kit congressuale, welcome cocktail, coffee breaks, attestato di partecipazione.

** La quota comprende: welcome cocktail, tour centro città, cena di gala.

SCHEDA DI ISCRIZIONE

Si prega di compilare la presente scheda in stampatello in ogni sua parte ed inviarla, accompagnata dal pagamento, alla Segreteria Organizzativa:

FASI Srl
Via R. Venuti, 73 - 00162 Roma
Tel. 06.97605625 - Fax 06.97605650
e-mail: a.ditofano@fasiweb.com



DATI DEL PARTICIPANTE

Cognome		Nome
Indirizzo		
Cap	Città	Provincia
Tel.	Fax	Cell.
E-mail		
Dip.to/Istituto		

QUOTE DI ISCRIZIONE	entro il 30 maggio	dopo il 30 maggio
Soci Ordinari	☐ € 330,00+IVA 21%	☐ € 430,00+IVA 21%
Non Soci	☐ € 390,00+IVA 21%	☐ € 510,00+IVA 21%
Tecnici Soci	☐ € 230,00+IVA 21%	☐ € 300,00+IVA 21%
Tecnici non Soci	☐ € 290,00+IVA 21%	☐ € 380,00+IVA 21%
Non Strutturati Soci*	☐ € 130,00+IVA 21%	☐ € 170,00+IVA 21%
Non Strutturati non Soci*	☐ € 210,00+IVA 21%	☐ € 275,00+IVA 21%
Accompagnatori* *	☐ € 150,00+IVA 21%	☐ € 195,00+IVA 21%

La quota comprende: accesso sessioni scientifiche, kit congressuale, welcome cocktail, coffee breaks, lunch, cena di gala, attestato di partecipazione.

* La quota comprende: accesso sessioni scientifiche, kit congressuale, welcome cocktail, coffee breaks, attestato di partecipazione.

** La quota comprende: welcome cocktail, tour centro città, cena di gala.

Per usufruire della quota Socio è necessario essere in regola con le quote associative (2013 compreso)

MODALITÀ DI PAGAMENTO Attenzione includere IVA nel totale

Il pagamento della quota può avvenire tramite:

☐ **Bonifico bancario** Allego copia del bonifico bancario di € _____

Beneficiario FASI Srl - Banca Popolare di Bergamo - Credito Varesino - IBAN IT07K0542803205000000092347

Si prega di indicare nella causale del versamento, cognome + nome + AIPaCMeM 2013.

☐ **Carta di credito** Autorizzo FASI Srl ad addebitare l'importo di € _____ sulla carta di credito:

Nr. carta	☐ VISA	☐ MASTERCARD	Scadenza (MM/AA)	CVV2 (obbligatorio) ultimi 3 numeri sul retro della carta
_____	_____	_____	____/____	_____

Cognome e nome titolare _____

FATTURAZIONE - Si prega di intestare ed inviare la fattura a:

P.I./C.F. (obbligatorio) _____

In caso di esenzione IVA, indicare l'art. _____

Data _____ Firma _____

I dati personali saranno utilizzati ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs. 196/2003 (Privacy)

Si dichiara di aver preso visione delle regole di cancellazione
Non verranno prese in considerazione le schede non accompagnate dal pagamento della quota di iscrizione

Abstracts

Per tutti i partecipanti che intendono sottomettere un contributo scientifico da pubblicare sulla rivista IL PATOLOGO CLINICO _ JOURNAL OF MOLECULAR AND CLINICAL PATHOLOGY, la data di scadenza è il **03 giugno 2013**.

I contributi dovranno essere inviati al seguente indirizzo e-mail:
segreteria nazionale@aipacmem.it

- il lavoro deve essere composto su word 2003 - 2007
- formato A4
- massimo una pagina
- carattere Times New Roman
- corpo 12
- interlinea singola

Il titolo deve essere scritto in lettere maiuscole, grassetto.

Per ogni autore va riportato il nome e il cognome per esteso (Times New Roman 12, corsivo). Per ogni autore va indicato l'Ente di provenienza (Times New Roman 12).

L'autore che presenterà il lavoro dovrà essere evidenziato mediante sottolineatura.

ECM

Solo i corsi pregressuali saranno accreditati.

Il congresso non sarà accreditato.

Segreteria Organizzativa:



FASI Srl

Via R. Venuti, 73 - 00162 Roma

Tel. 0697605610 | Fax 0697605650

a.ditofano@fasiweb.com | www.fasiweb.com

Elenco dei congressi e convegni AIPaC e AIPaCMeM

- 1° Convegno Nazionale dell'Associazione
Italiana dei Medici Analisti e Patologi (A.I.M.A.P.)
28 ottobre 1949 Roma**
- 2° Convegno 25 marzo 1950**
- 3° Congresso 1951**
- 4° Congresso 1952**
- 5° Congresso 1953**
- 6° Congresso 1954**
- 7° Congresso 1955**
- 8° Congresso 1956**
- 9° Congresso 1957**
- 11° Convegno Palermo 11-12 ottobre 1958**
- 12° Convegno Busto Arsizio 19-20 settembre 1959**
- 13° Convegno Firenze 24-25 giugno 1961**
- 14° Convegno 1962**
- 15° Convegno Napoli 22 giugno 1963**
- 16° Congresso 1964**
- 17° Congresso 1965**
- 18° Congresso Firenze 4-6 novembre 1967**
- 19° Congresso 1968**
- 20° Congresso Caserta 1969**
- 21° Congresso Sanremo ottobre 1970**
- 22° Congresso Firenze 21-24 ottobre 1971**
- 23° Congresso Napoli 7-10 dicembre 1972**
- 24° Congresso Sanremo 27-31 marzo 1974**
- 25° Congresso Vibo Valentia 25-28 giugno 1975**
- 26° Congresso Verona 11-13 giugno 1976**
- 27° Congresso Firenze 5-8 maggio 1977**
- 28° Congresso Sanremo 22-25 giugno 1978**
- 29° Congresso Bari 10-13 maggio 1979**

30° Congresso 29 maggio - 1 giugno 1980 Roma

La patologia Clinica per la tutela della salute e della qualità della vita

31° Congresso 2-5 aprile 1981 Giardini Naxos

La Patologia clinica guarda al 2000

32° Congresso 3-6 giugno 1982 Sanremo

La Patologia clinica ponte fra le discipline di base e le discipline cliniche

33° Congresso 23-27 marzo 1983 Sorrento

La patologia clinica disciplina di base per una efficace medicina sociale e preventiva

34° Congresso 9-13 maggio 1984 Bologna

Progresso nella tradizione

35° Congresso 24-27 aprile 1985 Padova

36° Congresso 21-24 maggio 1986 Ancona

Oggi nel futuro

37° Congresso 3-6 giugno 1987 Roma

All'avanguardia della medicina

38° Congresso 15-18 giugno 1988 Vibo Valentia

The research to improve your own life

39° Congresso e 15° Congresso mondiale 16-20 maggio 1989 Firenze

Era biotecnologica, tradizione culturale e nuova professionalità

40° Congresso 29 maggio-1 giugno 1990 - Bolzano

Il laboratorio nella valutazione dei fattori di rischio

41° Congresso 7-10 maggio 1991 Rimini

42° Congresso 19-22 maggio 1992 Napoli

Ricerca e prevenzione per la salute: Ruolo del patologo clinico

43° Congresso 1-4 giugno 1993 Bologna

Diagnostica di Laboratorio. Dalla cellula alla molecola

44° Congresso 24-27 maggio 1994 Rimini

Patologia Clinica: gestione-diagnostica-qualità globale

45° Congresso 30 maggio-2 giugno 1995 Baveno-Stresa

Il ruolo del patologo clinico nella diagnosi e cura

46° Congresso 28-31 maggio 1996 Fiuggi

Il Patologo Clinico nel nuovo scenario sanitario italiano

47° Congresso 3-6 giugno 1997 - Montecatini Terme

Il patologo Clinico nel percorso diagnosticoterapeutico

48° Congresso 2-5 giugno 1998 Salsomaggiore

Terme - Professionalità medica e managerialità

49° Congresso 11-14 maggio 1999 Napoli

“Cinquantanni” di patologia clinica

50° Congresso 9-12 maggio 2000 Milano

L'evoluzione del pensiero nella diagnostica di laboratorio

51° Congresso 15-18 maggio 2001 Palermo

Mondello - La qualità per la salute: Centralità del Patologo Clinico

52° Congresso 14-17 maggio 2002 Lecce

Il Patologo Clinico nell'organizzazione dipartimentale

53° Congresso 13-16 maggio 2003 Pesaro

Dalla standardizzazione dei processi alla diagnosi personalizzata

54° Congresso 18-21 maggio 2004 Roma

Il Patologo Clinico nella formulazione dell'ipotesi diagnostica

55° Congresso 24-27 maggio 2005 Cagliari

Ricerca, Diagnostica e Clinica: la logica della Salute

56° Congresso 29 maggio-1 giugno 2006 Genova

La patologia clinica: timone della nuova diagnostica

57° Congresso 27-30 novembre 2007 Caserta

Laboratorio e Governance Clinica

58° Congresso 10-13 giugno 2008 Caserta

Il laboratorio di patologia Clinica: motore di ricerca nella rete diagnostica

59° Congresso 12-15 maggio 2009 Tivoli (Roma)

Il Patologo clinico nella personalizzazione di una realtà globalizzata

60° Congresso 18-21 maggio 2010 Montesilvano (PE)

60 Anni tra Scienza e Professione

61° Congresso 10-13 maggio 2011 Caserta

Dall'alchimia alla medicina molecolare: il ruolo di una moderna società scientifica

62° Congresso 12-14 settembre 2012 Udine

1° Congresso Congiunto dell' Area di Patologia e Diagnostica di laboratorio
INFIAMMAZIONE: dalle fondamenta della Patologia Generale e Clinica alla
Medicina Personalizzata

RICORDO DEL PROF. GIOVANNI M. FERRI

Giovanni M. Ferri ci ha lasciati poco prima di Natale. Per me, per alcuni di noi, uniti da una profonda, intensa amicizia, Gianni è stato innanzi tutto un fraterno compagno di una vita, per oltre 40 anni, ha illuminato le nostre esistenze e ha condiviso le nostre esperienze al Policlinico Umberto I, nello studio, nella ricerca, nella preparazione di convegni, nei viaggi in paesi lontani.

La sua straordinaria umanità, unita alla profonda conoscenza della medicina, all'assoluta disponibilità ad aiutare tutti, studenti specializzandi colleghi, nella ricerca della verità, ci mancherà in maniera importante.

Prima nell'Istituto di Semeiotica Medica, diretto dal Prof. Michele Bufano e quindi dal Prof. Pierfrancesco Ottaviani, e poi nell'Istituto di Clinica Medica, diretto dal Prof. Lorenzo Bonomo, abbiamo vissuto insieme lo sviluppo delle nostre conoscenze nell'ambito della coagulazione, dell'ematologia, dell'immunologia, della medicina interna.

Con il suo carattere tranquillo, pronto a venire incontro alle nostre esigenze, a dare tutto l'aiuto possibile, Gianni era per tutti noi un costante, sicuro punto di riferimento.

Nel 2000, insieme, abbiamo accettato la richiesta dell'A.I.Pa.C.Me.M di organizzare il Corso di Ag-

giornamento Avanzato in Coagulazione. È iniziato un lungo cammino, ancora in corso, nel quale ogni anno preparavamo un programma di interesse generale, nei vari campi della medicina, e ne analizzavamo i riflessi clinici, diagnostici e terapeutici nell'ambito della coagulazione.

L'apporto dato dal Prof. Ferri lungo tutti questi anni è stato fondamentale ed essenziale. È stato insostituibile nel pensare i possibili temi, nella scelta dei relatori, nell'aiuto alla preparazione delle relazioni. Ha svolto tutta questa immensa attività quasi nel silenzio, dietro le quinte, con la sua straordinaria onestà professionale ed umana.

Il suo ricordo ci accompagnerà sempre, il suo esempio sarà per tutti noi, che abbiamo avuto il dono di conoscerlo e di amarlo, uno stimolo a proseguire un cammino, un programma di vita che ci ha insegnato, anche negli ultimi tempi, accettando con grande forza d'animo le sofferenze del male.

Alle care Piera e Flaminia, che gli sono state sempre vicino con grande amore, il nostro più affettuoso abbraccio.

Prof. Giuseppe Maria
Gandolfo

MECCANISMI MOLECOLARI DELL'ASSOCIAZIONE HLA E MALATTIE AUTOIMMUNI

SERGIO BAROCCI*, PAOLO ANTONELLI**, ATTILIO FABIO CRISTALLO***

* Docente di Storia dell'Immunologia, Dipartimento Scienze, Università Popolare Don Orione, Genova

** Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale Ospedale di Massa

*** Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale Ospedale Santa Chiara, Trento

Riassunto

L'associazione tra molecole HLA e diverse malattie autoimmuni è nota da tempo. Tuttavia, rimangono ancora da chiarire le basi molecolari di tali associazioni per la mancata identificazione di uno o più autoantigeni come bersagli. Sono stati di recente compiuti dei progressi nell'identificazione di epitopi di antigeni immunogenici e nell'analisi della struttura cristallografica di particolari molecole HLA; ciò ha consentito una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell'associazione HLA e spondilite anchilosante, narcolessia, malattia celiaca e diabete di tipo 1. In questa rassegna, queste patologie vengono analizzate in dettaglio per dimostrare come il polimorfismo del sistema HLA sia in grado di contribuire direttamente alla suscettibilità o alla protezione delle medesime. Tali analisi assumono un notevole interesse nella pratica clinica, soprattutto per l'identificazione dei soggetti a rischio e per l'elaborazione di nuove strategie terapeutiche volte a inibire o prevenire il processo autoimmune.

Summary

The association of HLA molecules with different autoimmune diseases has long been known. However, it still remains to be clarified the molecular basis of such associations for the failure to identify one or more autoantigens as targets. In four autoimmune disorders such as ankylosing spondylitis, narcolepsy, celiac disease and type 1 diabetes, the recent identification of epitopes of immunogenic antigens and the analysis of the crystallographic structure of particular HLA molecules has allowed a better understanding of the molecular mechanisms that underlie the association between HLA and these diseases. In this review, we analyzed these diseases in detail to demonstrate how the polymorphism of the HLA system is able to directly contribute to susceptibility or protection of the same. These analyses are of substantial interest in clinical practice, especially in the identification of those patients at risk and in the development of new therapeutic strategies designed to inhibit or prevent the autoimmune process.

Introduzione

Una delle caratteristiche più rilevanti del sistema immunitario è la capacità di discriminare tra antigeni self e non self. I linfociti maturi e funzionalmente competenti sono infatti in grado di riconoscere e rispondere agli antigeni esogeni, ma non possono riconoscere e/o rispondere agli antigeni autologhi. Questa caratteristica è del tutto peculiare del sistema immunitario: tutte le altre cellule e molecole coinvolte nell'omeostasi, nella difesa dell'ospite e nell'infiammazione non sono infatti in grado di discriminare tra il self e il non self. La perdita di tale proprietà, definita tolleranza verso il self, si traduce in risposte immunitarie verso i propri costituenti antigenici; la conseguenza di tali reazioni è

rappresentata dallo sviluppo di malattie autoimmuni. Il sospetto che alla base delle malattie autoimmuni ci fosse una predisposizione genetica emerse dall'osservazione che nelle coppie di gemelli se uno dei due si ammalava di una di queste malattie, l'altro presentava un rischio relativo maggiore rispetto alla popolazione generale di sviluppare la stessa patologia e che tale rischio risultava maggiore nei gemelli monozygoti (geneticamente identici) rispetto a quelli dizigoti (uguali solo per metà del patrimonio genetico). In seguito, l'osservazione che l'incidenza di alcune malattie genetiche è più alta in individui che possiedono uno specifico allele HLA nel proprio genoma rispetto a coloro che non lo possiedono ha permesso di comprendere che il legame tra patologie autoimmuni ed il sistema HLA trova il suo razionale nel ruolo cruciale che queste molecole svolgono nella maturazione dei linfociti T e nell'induzione delle risposte immunitarie verso gli antigeni proteici. Gli elenchi delle malattie autoimmuni associate ad uno specifico allele HLA sono andati via via arricchendosi (Jones et al, 2006). Tali associazioni non sono però equiparabili a quelle delle malattie monogeniche, in cui ad un determinato genotipo corrisponde un determinato fenotipo patologico; piuttosto, sono da inquadrare in un contesto multifattoriale, complesso, nel quale diversi fattori genetici ed ambientali aumentano il rischio relativo di sviluppare il fenotipo patologico. Entrambe le molecole HLA di classe I e di classe II risultano essere coinvolte nei meccanismi patogenetici delle malattie autoimmuni. Per quanto riguarda le molecole HLA di classe I, l'associazione più forte è tra la spondilite anchilosante (SA) e l'allele HLA-B27 (i portatori di questo allele hanno un rischio relativo 90 volte superiore di sviluppare la malattia rispetto ai non portatori). Tra le patologie associate agli alleli di classe II, sui quali si è recentemente concentrata l'attenzione per il coinvolgimento nella selezione e nella attiva-

zione dei linfociti T CD4+ (cellule in grado di regolare sia le risposte umorali che cellulari verso gli antigeni proteici), vanno menzionate per la loro importanza epidemiologica e clinica, il diabete di tipo 1, la malattia celiaca, l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e la narcolessia. Tuttavia, per tutte queste malattie, i meccanismi molecolari che stanno alla base dell'associazione con le molecole HLA sono a livello di ipotesi. In molti casi emergono potenziali associazioni con eventi ambientali, per esempio le infezioni (attraverso la stimolazione policlonale, il mimetismo molecolare o la semplice induzione di uno stato infiammatorio), o eventi endogeni, da intendersi come particolari assetti genetici delle molecole che presentano l'antigene.

Per spiegare l'associazione delle malattie autoimmuni con l'ereditarietà di particolari sequenze MHC sono state avanzate diverse ipotesi. In una prima ipotesi si focalizza l'attenzione sul fatto che la struttura delle molecole MHC condiziona il processo di selezione negativa durante la maturazione dei linfociti T. Le molecole MHC nel timo di un individuo non possono legarsi alle proteine self con alta affinità. Infatti, le cellule T immature rivolte verso tali autoantigeni possono sfuggire alla selezione negativa e maturare fino a raggiungere la completa competenza funzionale. Un'altra ipotesi sostiene che le molecole MHC di classe II potrebbero influenzare l'attivazione dei linfociti T ad azione regolatrice, la cui funzione normale è quella di prevenire l'autoimmunità. In una terza, invece, il gene associato alla malattia potrebbe non essere un allele HLA ma un gene diverso localizzato all'interno del locus HLA e ad esso associato in linkage disequilibrium (Barocchi et al, 2004). Un possibile ruolo da protagonista potrebbe, ad esempio, essere interpretato dai geni coinvolti nella processazione e nel trasporto degli antigeni come quelli codificanti per i proteosomi (LMP2 e LMP7 o Large Multifunctional Protease) e per i transporter (TAP1 e TAP2 o transport associated with antigen processing), oppure dai geni codificanti per le citochine situati nella regione HLA, come il TNF (tumor necrosis factor). Sempre dal punto di vista della predisposizione genetica, è stato osservato che molti degli antigeni HLA associati con le malattie differiscono dalle molecole non associate solo nella tasca di legame per l'antigene; questa osservazione non deve sorprendere dal momento che i residui polimorfici delle molecole MHC sono localizzati dentro e intorno alla tasca e che questi residui polimorfici sono fondamentali ai fini della presentazione dell'antigene e del riconoscimento da parte dei linfociti T. Queste osservazioni confermano l'ipotesi che le molecole MHC sono in grado di influenzare lo sviluppo dell'autoimmunità controllando la selezione e l'attivazione dei linfociti T. Tra i fattori non genetici che possono favorire l'insorgenza delle malattie autoimmunitarie vanno annoverati le infezioni virali e batteriche, le alterazioni anatomiche tissutali e le influenze ormonali. Benchè le infezioni precedano spesso le manifestazioni cliniche autoimmuni, virus e batteri non esercitano un'azione le-

siva evidente in queste patologie, tant'è vero che non sono isolabili nell'individuo quando queste si manifestano, né sono presenti a livello delle lesioni. Il loro coinvolgimento è da ricercarsi nelle interazioni con il sistema immunitario e nella modulazione della risposta immunitaria stessa. Si pensi per esempio alla stimolazione policlonale in cui linfociti con specificità recettoriali differenti sono contemporaneamente attivati da sostanze che interagiscono con molecole di superficie diverse dal recettore deputato al riconoscimento antigenico: l'esempio classico di tale fenomeno è rappresentato dal lipopolisaccaride batterico, in grado di attivare i linfociti B e, tra essi, quelli indotti in stato di anergia clonale dai meccanismi di selezione periferica. Per quanto riguarda i linfociti T, la comparsa di linfociti T autoreattivi citolitici consiste generalmente in un'attivazione policlonale di cellule con un limitato repertorio di Ig e TCR (l'autoimmunità non è quindi associabile ad un particolare polimorfismo dei geni V variabili); questo meccanismo con danno cellulare diretto rientra nella patogenesi del diabete mellito insulino-dipendente, dell'artrite reumatoide e della sclerosi multipla.

Un altro meccanismo innescato dalle infezioni è quello della cross-reazione tra antigeni self ed estranei: in questo caso, una normalissima risposta immunitaria verso antigeni microbici e quindi estranei rivolge il proprio potenziale offensivo verso antigeni del self per la presenza di epitopi uguali. Questo fenomeno, definito mimetismo molecolare, è alla base della malattia reumatica, nella quale anticorpi anti-streptococcici cross reagiscono con proteine del miocardio umano (si possono classificare in questo ambito anche l'anemia emolitica autoimmune, la porpora trombocitopenica, la sindrome di Goodpasture, il pemfigo, il morbo di Graves, la miastenia gravis). Anche un'alterazione anatomica tissutale indotta dall'infiammazione, secondaria o meno ad infezioni, può costituire un evento scatenante una risposta autoimmune. In questo caso entrerebbero in gioco due distinti processi: in primo luogo, l'evento responsabile dell'infiammazione, per esempio un trauma o un'ischemia, condurrebbe all'esposizione di antigeni self normalmente "nascosti", che non avendo indotto nel sistema immunitario uno stato di tolleranza nei loro confronti, sarebbero riconosciuti come estranei; in secondo luogo, lo stesso processo infiammatorio comporterebbe alterazioni strutturali degli antigeni self con formazione di nuovi determinanti capaci di evocare reazioni autoimmuni.

Per quanto concerne i fattori ormonali è un dato di fatto che la maggior parte delle malattie autoimmuni tende a colpire in misura maggiore gli individui di sesso femminile rispetto alla controparte maschile. I meccanismi alla base di tale differenza non sono del tutto chiari; gli ormoni sessuali sembrerebbero giocare un ruolo fondamentale come modulatori di queste malattie, sia in termini di insorgenza che di cronicizzazione. Si pensi per esempio al lupus eritematoso sistemico (LES) e all'artrite reumatoide (AR): nel LES la matura-

zione dei linfociti B e la conseguente produzione di autoanticorpi sono favoriti dalla prolattina e dagli estrogeni; il LES è più frequente nell'età fertile, diminuisce drasticamente nella menopausa, subisce un notevole peggioramento durante la gravidanza e un miglioramento nel post-partum; l'AR è invece più comune tra le donne in menopausa, tende a migliorare durante la gravidanza e usualmente presenta una riacutizzazione subito dopo il parto. Alla luce di queste considerazioni, è evidente come siano numerosi i tasselli mancanti e necessari al completamento di quel mosaico che è la patogenesi delle malattie autoimmuni HLA associate (Caillat-Zucman, 2009).

Spondilite anchilosante e HLA-B27

La spondilite anchilosante (o morbo di Bechterew, pelvispondilite anchilopoietica, spondiloartrite anchilosante) è una malattia infiammatoria cronica che coinvolge principalmente lo scheletro assiale e l'articolazione sacro-iliaca, ma può colpire anche le articolazioni periferiche. L'associazione tra HLA-B27 e SA è una delle più forti tra sistema HLA e malattie autoimmuni attualmente segnalate. Infatti, il 90-95% dei pazienti con SA risulta positivo per l'allele HLA-B27, a fronte di un 10% di soggetti sani, conferendo a questo allele un rischio relativamente alto (> 100). Considerando che la prevalenza della malattia è tra lo 0,1% e l'1,5%, il rischio assoluto di sviluppare una SA è di circa il 5% negli individui HLA-B27 positivi; per cui risulta che la maggior parte degli individui HLA-B27 positivi non è in grado di contrarre la malattia. Il tasso di concordanza è del 63% per le coppie di gemelli monozigoti HLA B27 positive, del 23% per le coppie di gemelli dizigoti (Caillat-Zucman, 2009); ciò indica che il contributo di questo allele per la malattia è pari a circa il 20-30% del rischio totale genetico, mentre tutta la regione HLA contribuisce per circa il 40-50%. Il fatto che l'HLA-B27 sia direttamente coinvolto nella patogenesi della SA è supportato dall'osservazione che tale associazione è stata osservata in quasi tutte le popolazioni, anche di diversa etnia, nel contesto di aplotipi multipli, e dal fatto che ratti transgenici HLA-B27 positivi sono in grado di sviluppare una malattia che assomiglia alla SA umana (Hammer et al, 1990). Tuttavia, i meccanismi alla base dell'associazione HLA-B27 e SA sono ancora sconosciuti. Sono state proposte tre teorie (Marcilla and Lopez de Castro, 2008): nella prima, la "arthritogenic theory", l'allele HLA-B27 presenterebbe un epitopo peptidico (antigene di *Klebsiella pneumoniae*?) in grado di suscitare una risposta da parte di linfociti T citotossici contro il medesimo e verso un epitopo autologo cross-reagente; nella seconda teoria, "misfolding", la tendenza naturale delle catene pesanti dell'HLA-B27 di accumularsi nel reticolo endoplasmatico (ER) per problemi di assemblaggio, comporterebbe da parte dell'ER una attivazione "da stress" della proteina NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated

B cells), con il conseguente rilascio di citochine pro infiammatorie come il TNF- α da parte di monociti e macrofagi; nella terza teoria, "omodimero di superficie", le catene pesanti dell'HLA-B27 non complesate con la α 2-microglobulina ed espresse sulla superficie cellulare potrebbero comportarsi funzionalmente come molecole di classe II ed interagire con linfociti T helper. Nessuna di queste teorie è comunque in grado di spiegare la specificità tessutale della malattia; inoltre, non tutti gli allotipi HLA-B27 presentano lo stesso effetto predisponente: mentre gli alleli HLA-B*27:02, B*27:04 e B*27:05, e probabilmente anche B*27:07, sono associati alla SA, gli alleli HLA-B*27:06 e B*27:09 non lo sono. È da rimarcare che gli alleli HLA-B*27:05 e B*27:09 differiscono solo per un residuo amminoacidico (Asp116His). Una nuova teoria sulla patogenesi della SA è quella dell'interazione genica: l'ipotesi è che geni ERAP1 mutanti (l'ERAP1 è una aminopeptidasi presente nel lume dell'ER che partecipa al processo di costruzione del peptide N terminale degli antigeni di classe I), inducano alterazioni strutturali negli allotipi HLA-B27 cosiddetti predisponenti. Un'analoga interazione gene-gene, ovvero ERAP1-HLA, si riscontra nella psoriasi e l'allele HLA-C*06 (Diaz-Pena et al, 2012).

La narcolessia e l'HLA-DQB1*06:02

La narcolessia è una malattia cronica invalidante del sonno di origine sconosciuta, caratterizzata principalmente da una eccessiva sonnolenza diurna e cataplessia. Nella narcolessia è presente una forte predisposizione genetica: praticamente tutti i pazienti con narcolessia e cataplessia, hanno parenti di primo grado similmente affetti. Più del 90% dei narcolettici sono portatori dell'allele HLA-DQB1*06:02 (Faraco and Mignot, 2011; Matsuki et al, 1992), presente in meno di un terzo della popolazione generale. Ricerche recenti hanno messo in evidenza una severa riduzione o anche l'assenza di un neuromediatore chiamato ipocretina od orexina nel liquido cefalorachidiano dei pazienti narcolettici (Peyron et al, 2000). La penetranza del gene HLA-associato risulta bassa, ed il rischio di narcolessia nei parenti di primo grado, sebbene sia 40 volte superiore che nella popolazione generale, è solamente dell'1%. Non esiste una evidenza che indichi che la narcolessia sia un disordine auto-immunitario: la bassa penetranza del gene HLA-associato ed il fatto che nei gemelli mono- zigoti ci sia una significativa discordanza, depongono per una patogenesi multifattoriale (Menkes and Sarnat, 2000). L'allele HLA-DQB1*06:01, che differisce dall'allele HLA-DQB1*06:02 per soli nove residui amminoacidici, è da considerarsi protettivo ai fini della narcolessia; ciò suggerisce che le differenze nel sito di legame peptidico tra questi due alleli siano determinanti per la predisposizione o la protezione contro la narcolessia (Siebold et al, 2004). Studi cristallografici dell'aplotipo HLA-DQ6.2 (alleli HLA-

DQA1*01:02/DQB1*06:02) complessato con il peptide derivato dalla ipocretina a cui si lega con elevata affinità (Siebold et al, 2004), e dell'aplotipo DQ6.1 (alleli HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:01), hanno rivelato un'importante differenza nel sito di legame P4. Nella molecola HLA-DQ6.1, la presenza nel sito di legame P4 di un residuo di alanina (Ala13b) e di uno di tirosina (Tyr26b) impediscono l'interazione con la treonina presente nel peptide dell'ipocretina; questo non accade nella tasca P4 della molecola HLA-DQ6.2 dove sono invece presenti una glicina (Gly13b) e una leucina (Leu26b). Questa differenza potrebbe spiegare la suscettibilità nella narcolessia agli alleli HLA.

La malattia celiaca e l'HLA DQ2/DQ8.

La malattia celiaca è un disturbo complesso dell'intestino tenue causato da una risposta immunitaria verso il glutine, componente proteico della farina di frumento, orzo, segale e avena. È caratterizzata da atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrazione linfocitaria dell'epitelio e della lamina propria con conseguente malassorbimento di nutrienti e/o a diarrea cronica. In particolare, si è visto che la frazione tossica del glutine di frumento è rappresentata dalla sua componente alcool solubile, la gliadina. La gliadina presenta 4 frazioni elettroforetiche denominate a, b, g e w. Le gliadine sono costituite da singole catene polipeptidiche, di peso molecolare compreso tra i 30 e 75 kDa e sono caratterizzate da un alto contenuto di glutamina e prolina (32-56 glutamine e 15-30 proline ogni 100 residui amminoacidici). Poiché l'a-gliadina, la frazione meno tossica, ha il più alto contenuto di glutamina e prolina, la ricchezza di questi amminoacidi non sembra correlarsi con la lesività dell'intera molecola. L'isolamento di cloni di DNA complementari per la gliadina ha permesso di sequenziare e determinare i 266 amminoacidi costituenti l'a-gliadina, la sottofrazione tossica della gliadina. Mediante digestione cianobromidica e triptica sono state identificate nell'ambito dell'a-gliadina due sequenze tossiche "in vitro" caratterizzate dalla ricorrenza dei due tetrapeptidi -gln-gln-gln-pro e pro-ser-gln-gln (Shan et al, 2002). L'importanza di questi 2 oligopeptidi è indirettamente confermata dal fatto che sono assenti nei cereali non tossici, quali mais e riso, e dal fatto di non poter essere ulteriormente digeriti da parte di enzimi attivi "in vivo", quali pepsina, tripsina, chimotripsina, pancreatina ed endoproteinasi (Matysiak-Budnik et al, 2008). Sono stati recentemente sintetizzati tre peptidi corrispondenti a dei residui dell'a-gliadina. Solo la somministrazione "in vitro" della sequenza -gln-gln-gln-pro ma non di quella -pro-ser-gln-gln, ha riattivato le lesioni intestinali in un gruppo di celiaci in dieta priva di glutine. Questa sequenza dell'a-gliadina è ora considerata l'agente lesivo della malattia celiaca. Il riconoscimento di questo peptide nella patogenesi della malattia celiaca è ulteriormente confermato dal fatto che viene riconosciuto da linfociti T-gliadina

specifici DQ2 ristretti (Lundin et al, 1993).

Dal punto di vista pratico, con il termine glutine si intendono correntemente le prolamine presenti nel frumento (gliadine), nell'orzo (ordeine) e nella segale (secaline). Le prolamine sono le proteine responsabili nel cibo della reazione immunitaria nella celiachia; sono così chiamate perché ricche di residui di prolina e glutamina, resistenti alle proteasi e alle peptidasi dell'intestino.

In passato l'avena veniva inclusa tra i cereali tossici per il celiaco; studi recenti hanno invece dimostrato che l'assunzione prolungata di avena non risulta tossica per i malati di celiachia (Janatuinen et al, 2000; Picarelli et al, 2001), se si eccettuano casi estremamente gravi (Reunala et al, 1998); a differenza di gliadine, ordeine e secaline, l'avenina ha infatti un modestissimo contenuto di prolina (<5% contro un 17-23% nelle altre prolamine); inoltre, nell'avena, l'avenina rappresenta solo il 5- 15% delle proteine totali.

Approssimativamente il 95% dei pazienti celiaci esprime la molecola HLA-DQ2 (aplotipo HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01); il rimanente esprime la molecola HLA-DQ8 (aplotipo DQA1*03:01-DQB1*03:02). Gli aplotipi HLA - DQ2/DQ8 spiegano circa il 40% della ereditarietà della celiachia; questi aplotipi sono tuttavia presenti anche in quasi il 40% della popolazione generale. Un individuo con DQ2 o DQ8 presenta all'incirca il 2% di rischio di celiachia, ma se ha già un familiare affetto, tale rischio sale a circa il 20%. Avere il DQ2 su entrambe gli alleli innalza il rischio di malattia fino al 28% in un familiare di celiaco. Familiari di primo grado di pazienti celiaci hanno infatti una prevalenza di malattia celiaca di circa il 10% e tale prevalenza sale al 30% quando si considerano fratelli e sorelle HLA identici. La concordanza molto elevata, ma non assoluta (70%) tra gemelli monozigoti rispetto al 10% nei parenti di primo grado, conferma l'importanza dei fattori ambientali nell'insorgenza della malattia celiaca (Greco et al, 2002; Maki et al, 2003).

Si ritiene inoltre che via siano numerosi altri geni coinvolti nel complesso profilo della intolleranza al glutine (Volta et al, 2009). Il quadro si complica ancora di più se si tiene conto che sono numerose le patologie associate alla celiachia come per esempio il diabete di tipo 1 (Maki et al, 2003), la tiroidite di Hashimoto (Sategna et al, 2001), la sindrome di Down (Carnicer et al, 2001), la sindrome di Turner (Bonamico et al, 2002; Gravholt 2004), il deficit di IgA (Lenhardt et al, 2004) e la dermatite erpetiforme (Hervonen et al, 2000).

Le molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8 sono quindi da considerarsi necessarie ma non sufficienti a scatenare la celiachia, tant'è vero che la maggior parte degli individui DQ2 o DQ8 positivi rimangono in buona salute.

La base molecolare dell'associazione HLA e malattia celiaca consiste nel legame delle molecole DQ2 e

DQ8 ai peptidi della gliadina: questo legame è possibile solo se i peptidi della gliadina sono stati enzimaticamente modificati dalla transglutaminasi tissutale di tipo 2 (tTG2). La tTG2 è stata identificata come il principale antigene self coinvolto nella celiachia, nonché come l'antigene riconosciuto dagli anticorpi anti-endomisio; è un enzima ubiquitario calcio-dipendente, localizzato principalmente nel citosol, con una piccola frazione che risulta ancorata alla membrana cellulare. In condizioni normali oltre il 90% delle proteine attraversa la barriera intestinale per la via transcellulare: i peptidi subiscono una degradazione lisosomiale che li rende inattivi dal punto di vista immunologico. Le rimanenti frazioni antigeniche vengono invece trasportate intatte attraverso la via paracellulare grazie a una fine regolazione delle giunzioni strette (TJ, tight junctions); ciò determina lo sviluppo di una risposta immunitaria che si traduce in uno stato di tolleranza antigenica (Fasano et al, 2001; Lionetti, 2002). Nelle prime fasi della celiachia l'integrità delle TJ e quindi la permeabilità dell'epitelio intestinale risulta alterata (Fasano et al, 2000; Schulzke et al, 1998); si assiste perciò ad un maggiore assorbimento di macromolecole, tra cui il glutine. Superata la barriera intestinale, la gliadina subisce la deaminazione ad opera della tTG2; questo enzima catalizza una reazione calcio-dipendente di deaminazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutammina in acido glutammico che è carico negativamente (Dieterich et al, 1997; Molberg et al, 1998); sarebbe soprattutto lo spazio tra gli aminoacidi glutammina e prolina a giocare un ruolo essenziale nella specificità della deaminazione (Koning, 2005). Solo dopo aver subito la deaminazione la gliadina acquisisce quelle cariche negative che le conferiscono una forte affinità per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 poste sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC) ai linfociti T CD4+ della lamina propria (Arentz-Hansen et al, 2002; Bergseng et al, 2005; Johansen et al, 1996; van de Wal et al, 1996). Per quanto riguarda l'affinità all'HLA-DQ2 è sufficiente un singolo sito di deaminazione della gliadina; ne occorrono invece due per l'HLA-DQ8 e questo spiegherebbe la bassa penetranza del DQ8, 5%, vs il DQ2, 95%, negli individui affetti da celiachia (Henderson et al, 2007; Karrell et al, 2003). I linfociti T CD4+, in seguito allo stimolo, secernono citochine come interleuchina 4 (IL-4) che promuovono l'espansione di cloni auto-reattivi di cellule B producenti anticorpi anti-gliadina, anti-tTG2 tessutale e anti-complessi proteici tTG2-gliadina; ciò innescerebbe i meccanismi del danno tessutale, con una inibizione del differenziamento delle cellule epiteliali (Anderson et al, 2000; Cinova et al, 2007; Molberg et al, 2000; Sollid et al, 1997; Schuppan, 2000).

A tutt'oggi la cura della celiachia consiste comunque in una dieta che deve essere rigorosamente senza glutine e che deve mirare a riequilibrare le carenze nu-

trizionali conseguenti al malassorbimento (Sollid, 2002).

Il diabete di tipo 1

Il diabete di tipo 1 (TD1) è una malattia multifattoriale e poligenica che colpisce circa l'1% della popolazione. È il risultato di una specifica distruzione delle cellule β delle isole pancreatiche di Langerhans secernenti insulina mediata da cellule T autoreattive. La distruzione autoimmune delle isole inizia molto prima della comparsa clinica della malattia, cioè con l'iperglicemia, e la presenza di specifici autoanticorpi dalle isole pancreatiche può essere rilevata anche diversi anni prima della comparsa della malattia conclamata. Tuttavia, a differenza della malattia celiaca in cui l'identificazione di epitopi immunogenici della gliadina presentati alle cellule T CD4+ ha aperto uno spiraglio sulla comprensione dei meccanismi molecolari dell'associazione HLA e malattia, nel T1D la mancata conoscenza di epitopi immunogenici rilevanti di malattia da parte di cellule T è stata per lungo tempo un handicap. Risposte di cellule T circolanti contro diversi autoantigeni espressi nelle cellule isole pancreatiche come proinsulina, acido glutammico decarbossilasi (GAD 65) e la proteina isola specifica correlata alla subunità catalitica della glucosio-6-fosfatasi (IGRP) sono state evidenziate sia in esseri umani che in topi diabetici non obesi (NOD) (Atkinson et al, 1992; Godkin et al, 1997; Kwok et al, 1996; Viglietta et al, 2002). Tra questi, la proinsulina, che è il prodotto principale delle cellule β pancreatiche, rappresenta il solo autoantigene conosciuto nel T1D espresso esclusivamente nelle cellule β (con la rara eccezione di alcune cellule che esprimono alcuni antigeni self nel timo). Gli autoanticorpi rivolti verso la proinsulina sono presenti molto prima della manifestazione clinica della malattia e rappresentano un forte fattore di rischio per lo sviluppo del TD1 in individui geneticamente predisposti (Achenbach et al, 2004; Alleva et al, 2001; Wong et al, 1999). Si ritiene quindi che la proinsulina possa rappresentare l'autoantigene bersaglio primario. Come per la malattia celiaca, la regione HLA è in grado di influenzare in larga parte la suscettibilità alla malattia geneticamente determinata. La concordanza del TD1 tra gemelli monozygoti e dizigoti (70% vs 10%) fa propendere anche per la presenza di un fattore ambientale in grado di favorire l'insorgenza della malattia in individui geneticamente predisposti. Circa il 50% del rischio genetico di TD1 può essere attribuito a geni HLA dei loci DRB1, DQA1 e DQB1 (Erlich et al, 2008; Noble et al, 1996; Thompson et al, 2007). Il profilo allelico di questi loci non segue però il modello di condivisione degli aplotipi HLA tra coppie di fratelli affetti: il tasso di concordanza è infatti del 15% in fratelli HLA-identici, del 5% in fratelli HLA aplo-identici, dell'1% in fratelli HLA differenti; sono stati peraltro individuati ulteriori loci di suscettibilità del T1D nel-

la regione HLA. Alla luce di questi risultati, la comprensione della base molecolare dell'associazione tra HLA e TD1 risulta molto più complessa rispetto a quanto avviene nella malattia celiaca. Il rischio più alto di sviluppare il T1D viene associato nella popolazione caucasica agli aplotipi HLA di classe II DR3-DQ2 e DR4-DQ8 (Noble et al, 1996). È stata stabilita una gerarchia del rischio legato all'HLA che va da aplotipi altamente predisponenti ad aplotipi altamente protettivi (Erlich et al, 2008; Undlien and Thorsby 2001). Per esempio, l'allele HLA DQB1*03:02 è considerato un allele critico per l'insorgenza della malattia, come risulta dal confronto tra il rischio relativo conferito dall'aplotipo altamente predisponente HLA-DRB1*04:01-DQB1*03:02 e l'aplotipo neutro HLA-DRB1*04:01-DQB1*03:01. L'aplotipo HLA-DRB1*04:03-DQB1*03:02 risulta invece protettivo (rischio relativo 0,3); ciò indica che il rischio di malattia può essere fortemente modulato dai polimorfismi critici del gene DRB1 (Erlich et al, 2008; Harfouch-Hammoud et al, 1996). Sebbene l'associazione tra HLA e T1D sia molto complessa, ci si può avvalere per studiarla di un modello animale, il topo NOD, che sviluppa spontaneamente una patologia sorprendentemente simile al T1D umano: il solo allele MHC di classe II espresso dal topo è I-AG7. Studi strutturali delle molecole MHC di classe II dell'uomo e del topo associate a TD1 hanno dimostrato che queste molecole presentano alcune caratteristiche specifiche. Infatti, le molecole HLA-DQ2, HLA-DQ8 e I-AG7 hanno un'identica sostituzione amminoacidica nella posizione 57 della catena b (Ala o Ser è 57 anziché Asp è 57) che porta ad un cambiamento nelle proprietà generali delle molecole di classe II (Horn et al, 1988; Todd et al, 1987). La maggior parte degli altri alleli considerati "neutri o di protezione" contengono in questa posizione un residuo conservato di aspartato; questo residuo forma un ponte salino con una opposta arginina nella posizione 76 della catena è, definendo le caratteristiche strutturali della tasca P9 del solco di legame (Lee et al, 2001). La risoluzione della struttura della molecola I-AG7 complessata con un peptide ad alta affinità dell'autoantigene GAD 65 (Corper et al, 2000) ha dimostrato come tale molecola si leghi preferenzialmente ai peptidi con residui della tasca P9 acidi. Confrontando la struttura della molecola I-AG7 con quella del DQ8 nel complesso con un peptide immunodominante dall'insulina (Lee et al, 2001) e quella del DQ2 (Kim et al, 2004) è emersa una somiglianza del peptide di legame nelle tasche del DQ8, del DQ2 e dell'I-AG7, soprattutto nel solco intorno alla posizione è 57 suggerendo che il diabete viene causato sia negli esseri umani che nei topi NOD dallo stesso evento di presentazione dell'antigene. La molecola DQ8 è da considerarsi un potente fattore di suscettibilità rispetto alla molecola del DQ2 e il rischio associato all'eterozigosi DQ2/DQ8 sostituisce i rischi combinati connessi con DQ2 e DQ8. Questo ha por-

tato all'ipotesi che eterodimeri codificati in posizione trans risultino più efficienti nel presentare epitopi alle cellule T rispetto a dimeri diabetogeni codificati in posizione cis.

Gli eterodimeri DQ (DQA1*03:01/DQB1*02:01 o DQA1*05:01/DQB1*03:02), che sono codificati in posizione trans negli eterozigoti DQ2/DQ8, sono funzionali per la presentazione dell'antigene, e i peptidi che combinano le posizioni di legame DQ2 e DQ8 possono essere presentati alle cellule T da questi dimeri codificati in trans. Per esempio, un peptide con residui di glutammato in P1 e P4 può essere presentato più efficacemente nel contesto di un dimero codificato in trans piuttosto che di un dimero DQ2 codificato in cis dal momento che la tasca P1 della molecola DQA1*03:01/DQB1*02:01 contiene meglio la catena laterale carica negativamente dell'aminoacido. L'associazione tra HLA e diabete di tipo 1 è caratterizzata anche dalla presenza di aplotipi protettivi, in particolare DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02. L'allele DQB1*06:02 su questo aplotipo è in grado di conferire una protezione pressoché assoluta contro il diabete di tipo 1, anche in presenza dell'allele DQB1*03:02 sull'altro aplotipo. Particolarmente interessante è la molecola DQ6 (DQA1*01:02-DQB1*06:02); a suo modo rappresenta un paradosso, perché da un lato conferisce protezione dominante per il T1D, dall'altro forte suscettibilità per la narcolessia. Queste due associazioni sono tra le più forti sinora conosciute per i disordini MHC associati. La struttura cristallina a risoluzione di 1,8 ångström della molecola DQ6 ha reso possibile un'analisi dettagliata a tre dimensioni e ha quindi permesso di elaborare un modello atomico dei meccanismi predisponenti o protettivi. Sembra che il volume della tasca P4 nel solco del peptide di legame sia associato con la suscettibilità alla narcolessia, mentre il volume della tasca P6 e la specificità della tasca P9 siano determinanti per conferire protezione dominante verso T1D.

Contrariamente alla malattia celiaca, dove la possibilità di studiare la mucosa intestinale ha consentito di caratterizzare l'epitopo antigenico, un simile approccio nel T1D umano presenta problemi quasi insormontabili, poiché il pancreas non è accessibile. Pertanto è molto difficile stabilire se epitopi antigenici naturalmente selezionati "in situ" dalle molecole HLA-predisponenti, e che si ritengono potenziali candidati nella eziopatogenesi, possano essere così rilevanti per la malattia in questione. Tuttavia, recentemente, è stato riportato che cellule T CD4+ HLA-DR4 ristrette che reagivano con i primi aminoacidi della catena A dell'insulina rappresentavano una quota percentualmente elevata delle cellule T nei linfonodi pancreatici di due soggetti con T1D, ma non nei linfonodi di donatori sani (Kent et al, 2005). Ciò suggerisce che l'insulina possa essere effettivamente considerata un autoantigene bersaglio principale in grado di causare T1D. È stato possibile di-

mostrare che il riconoscimento di questo epitopo DR4-ristretto all'interno dei primi 13 aminoacidi della catena A dell'insulina umana da parte di cloni di cellule T CD4+ derivati da pazienti con T1D o prediabetici dipende dalla formazione di un legame disolfuro tra due residui di cisteina adiacenti, che non alterano il legame del peptide al DR4 (DRB1*0401, *04:04, o *04:05), ma che incidono sulla conformazione e sull'accessibilità alla porzione centrale dell'epitopo. Ne consegue che un epitopo immunogenico che risulta dalla modificazione naturale post-traslazionale, rappresenta un altro esempio di bersaglio della risposta autoimmune. Se questo peptide viene specificamente modificato nel sito di infiammazione, vale a dire nelle cellule pancreatiche, come i peptidi deamidati della gliadina nella mucosa di pazienti celiaci, non è più identificato come self.

Anche se i principali determinanti genetici di suscettibilità sono stati mappati nei geni HLA-DRB1 e DQB1 di classe II, questi geni da soli non possono spiegare l'associazione tra T1D e la regione MHC. Cellule T CD8+ MHC di classe I reattive giocano infatti un ruolo fondamentale nello sviluppo della malattia: le cellule T CD8+ specifiche per l'insulina B e per IGRP rappresentano i primi ed essenziali attori nella patogenesi del T1D dei topi NOD, e cellule T CD8+ isole specifiche circolanti sono state rinvenute nei pazienti prediabetici e di recente scoperte in pazienti con T1D (Martinuzzi et al, 2008). Sembra che alcuni alleli HLA di classe I, in particolare HLA-A24 e HLA-B39, forniscano contributi aggiuntivi per l'eziologia del TD1 e del tasso di distruzione delle cellule β delle isole pancreatiche (Honeyman et al, 1995; Nejentsev et al, 2007). Complessivamente, come per la malattia celiaca, questi dati non solo arricchiscono ulteriormente le nostre conoscenze sulla base molecolare dell'associazione HLA e TD1, ma impattano notevolmente sulla pratica clinica. Dato che la distruzione autoimmune delle isole pancreatiche inizia molto prima della manifestazione clinica della malattia, cioè con l'iperglicemia, è importante essere in grado di identificare i soggetti a rischio di sviluppare TD1. In individui prediabetici geneticamente predisposti, la risposta autoimmune in corso è dimostrata dalla presenza di autoanticorpi diretti verso le cellule insulari e dalle risposte delle cellule T periferiche. Pertanto, l'associazione di fattori genetici, sierologici, e cellulari permette di identificare i soggetti a rischio.

Riveste poi un grande interesse l'evidenziazione dell'allele DQB1*06:02 (Noble et al, 2011), che impedisce lo sviluppo della malattia conclamata, anche quando sono stati rinvenuti gli anticorpi anti-cellule insulari, proprio per identificare quegli individui che presentano un minimo rischio di progressione verso il TD1, specie nei parenti di primo grado dei pazienti. Pertanto, la positività del DQB1*06:02 dovrebbe entrare negli studi di prevenzione.

Dal punto di vista fisiopatologico, è stato suggerito

che l'autoimmunità potrebbe derivare da un difetto nei meccanismi di tolleranza centrali, cioè da alterata selezione timica. Poiché le molecole HLA sono espresse nel timo, alleli HLA predisponenti potrebbero consentire a cellule T potenzialmente autoreattive di sfuggire alla selezione negativa e guadagnare la periferia, mentre alleli di protezione favorirebbero la selezione negativa dei linfociti T autoreattivi. Tuttavia, l'osservazione che parenti di primo grado di pazienti con T1D DQB1*06:02 positivi e con in circolo anticorpi anti-cellule insulari non evolvono mai nella malattia conclamata, va contro l'ipotesi della delezione timica di linfociti T autoreattivi come principale meccanismo della protezione dominante mediata dall'allele DQB1*06:02. In alternativa, è stata proposta che la selezione timica positiva di cellule T regolatorie si riduca in presenza di molecole HLA predisponenti, in modo così da impedire la tolleranza periferica di antigeni self, mentre alleli HLA protettivi favorirebbero la selezione timica di tali cellule T regolatorie. La selezione timica di cellule T regolatorie sembra dipendere dall'affinità del recettore della cellula T per la selezione del complesso peptide-MHC-self. Il mantenimento di una struttura poco mutevole della molecola DQB1*06:02 potrebbe facilitare l'interazione ad alta affinità con un repertorio peptidico espanso e con la selezione di cellule T regolatorie in grado di rispondere rapidamente anche a danni minimi a carico delle cellule β insulari.

Conclusioni

Gli studi di associazione tra HLA e malattie autoimmuni hanno spesso fornito risultati contrastanti e non riproducibili. Poiché le varianti HLA sono state le prime ad essere ampiamente analizzate oltre 30 anni fa, sono state intrapresi studi di associazione di un ampio spettro di fenotipi, a volte in mancanza di un attento studio di progettazione e di valutazione di potenza statistica (Cardon and Bell, 2001). Sfortunatamente, ciò ha portato ad un gran numero di risultati non replicabili per le più svariate ragioni:

1. diversi studi hanno utilizzato dimensioni campionarie molto piccole, generando in tal modo risultati positivi non veritieri;
2. molte associazioni hanno perso di significatività dopo l'opportuno adeguamento eseguito per il numero di confronti effettivamente intrapresi;
3. i modus operandi della stratificazione della popolazione in studio (gruppi etnici e gruppi di controllo) che hanno dato luogo a false associazioni positive;
4. in molti studi non si è riuscito a rilevare un linkage disequilibrium con i loci adiacenti ed i modelli di linkage disequilibrium variano tra le popolazioni, e due associazioni apparentemente diverse possono riflettere una sottostante comune associazione allelica con un locus di accompagnamento;
5. l'eterogeneità della malattia non è stata molte volte presa in considerazione nella scelta del gruppo dei pazienti.

Gli studi di associazione restano comunque molto importanti, poiché un'attenta analisi dell'associazione tra sistema HLA e malattie autoimmuni può essere di grande interesse non solo per la comprensione della fisiopatologia delle malattie ma anche per la progettazione adeguata di nuove strategie terapeutiche attraverso la caratterizzazione di interazioni tra molecole HLA predisponenti ed epitopi immunogenici, e l'identificazione di soggetti a rischio che potrebbero essere inclusi nelle strategie profilattiche o terapeutiche. Gli esempi del glutine modificato e degli epitopi dell'insulina suggeriscono che tali modifiche potrebbero essere molto più frequenti del previsto tanto da essere considerate la ragione della rottura della self tolleranza a cui si assiste nelle malattie autoimmuni.

Bibliografia

Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonfacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type I diabetes. *J Clin Invest.* 2004; 114(4): 589-597.

Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL, Gaur A. A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetes to an immunodominant epitope of insulin. *J Clin Invest.* 2001; 107:173-180.

Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AVS. In vivo antigen challenge in coeliac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nature Med.* 2000; 6: 337-342.

Arentz-Hansen H, Mc Adam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 2002; 123: 803-809.

Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell I, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, Erlander MG, Tobin AJ, Maclaren NK. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1992; 339: 458-459.

Barocchi S, Fiordoro S, Santori G, Valente U, Mossa M, Antonelli P, Ferrara GB, Cannella G, Nocera A. Alport syndrome: HLA association and kidney graft outcome. *Eur J Immunogenet.* 2004; 31(3): 115-119.

Bergseng E, Xia J, Kim CY, Khosla C, Sollid LM. Main chain hydrogen bond interaction in the binding of proline-rich gluten peptides to the celiac disease-associated HLA-DQ2 molecule. *J Biol Chem.* 2005; 280: 21791-21796.

Bonamico M, Pasquino AM, Mariani P, Danesi HM, Culasso F, Mazzanti L, Petri A, Bona G. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;

87 5495-5498.

Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2009; 73 (1): 1-8.

Cardon LR and Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 91-99.

Carnicer J, Farré C, Varea V, Vilar P, Moreno J, Artigas J. Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001; 13 (3): 263-267.

Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, Cerna M, Pecharova B, Dvorak M, Fruhauf P, Tlaskalova-Hogenova H, Smith PD, Tuckova L. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol.* 2007; 27: 201-209.

Corper AL, Stratmann T, Apostolopoulos V, Scott CA, Garcia KC, Kang AS, Wilson IA, Teyton L. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. *Science* 2000; 288: 505-511.

Diaz-Pena R, Lopez-Vasquez A and Lopez-Larrea C. Old and new HLA associations with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 2012; 80: 205-213.

Dietrich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997; 3: 797-801.

Erlich H, Valdes AM, Noble JA, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy P. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type I diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 2008; 57: 1084-1092.

Faraco J and Mignot E. Immunological and Genetic Aspects of Narcolepsy. *Sleep Med Res.* 2011; 2: 39-47.

Fasano A, Not T, Wang W Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 358: 1518-1519.

Fasano A, Catassi C: Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120: 636-651.

Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151 657-687.

Godkin A, Friede T, Davenport M, Stevanovic S, Willis A, Jewell D, Hill A, Rammensee HG. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ3.2). *Int Immunol.* 1997; 9: 905-911.

Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large

- population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-628.
- Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β 2M: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990; 63:1099-1112.
- Harfouch-Hammoud E, Timsit J, Boitard C, Bach JF, Caillat-Zucman S. Contribution of DRB1*04 variants to predisposition to or protection from insulin dependent diabetes mellitus is independent of DQ. *J Autoimmun.* 1996; 9: 411-414.
- Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA, Beissbarth T, Tatham A, Mannering SI, Purcell AW, Dudek NL, Heel DA, McCluskey J, Rossjohn J, Anderson RP. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity* 2007; 27: 23-34.
- Hervonen K, Karell K, Holopainen P, Collin P, Partanen J, Reunala T. Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(6): 990-993.
- Honeyman MC, Harrison LC, Drummond B, Colman PG, Tait BD. Analysis of families at risk for insulin-dependent diabetes mellitus reveals that HLA antigens influence progression to clinical disease. *Mol Med.* 1995; 1: 576-582.
- Horn GT, Bugawan TL, Long CM, Erlich HA. Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6012-6016.
- Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJK, Kosma VM, Maki M, Heikkinen M, Uusitupa MIJ. No harm from five year ingestion of oats in celiac disease. *Gut* 2002; 50: 332-335.
- Johansen BH, Vartdal F, Eriksen JA, Thorsby E, Sollid LM. Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2. *Int Immunol.* 1996; 8: 177-182.
- Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(4): 271-282.
- Karrell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol.* 2003; 64 (4): 469-477.
- Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 2005; 435: 224-228.
- Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten episodes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4175- 4179.
- Koning F. Celiac disease caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology* 2005; 129: 1294-1301.
- Kwok WW, Domeier ML, Raymond FC, Byers P, Nepom GT. Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J Immunol.* 1996; 156: 2171-2177.
- Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC. Structure of a human insulin peptide/HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2001; 2: 501-507.
- Lenhardt A, Plebani A, Marchetti F, Gerarduzzi T, Not T, Meini A, Villanacci V, Martellosi S, Ventura A. Role of human-tissue transglutaminase IgG and anti-gliadin IgG antibodies in the diagnosis of coeliac disease in patients with selective immunoglobulin A deficiency. *Dig Liver Dis.* 2004; 36: 730-734.
- Lionetti P. The enteropathy of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002 (suppl); 34: 18-21.
- Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen, TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. Gliadin-specific HLA-DQ (α 1*0501, β 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med.* 1993; 178: 187-196.
- Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Hopfl P, Knip M. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2517-2524.
- Marcilla M and Lopez de Castro JA. Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2008; 71: 495-506.
- Martinuzzi E, Novelli G, Scotto M, Blancou P, Bach JM, Chaillous L, Bruno G, Chatenoud L, van Endert P, Mallone R. The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment. *Diabetes* 2008; 57: 1312-1320.
- Matsuki K, Grumet FC, Lin X, Guilleminault C, Dement WC, Mignot E. DQ rather than DR gene marks susceptibility to narcolepsy. *Lancet* 1992; 339: 1052.
- Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G, Bounnik Y, Lamarque D, Chaussade S, Malamut G, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Monteiro RC, Heyman M. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008; 205: 143-154.
- Menkes JH, Sarnat HB editors. *Child neurology*, 6th editino, 2000.
- Molberg O, McAdam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L. Tissue transglutaminase

- selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells. *Nat Med.* 1998; 4: 713-717.
- Molberg O, Adam SN, Sollid LM. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 3: 232-237.
- Nejentsev S, Howson JMM, Walker NM, Szeszkó J, Field SF, Stevens HE, Reynolds P, Hardy M, King E, Masters J, Hulme J, Maier LM, Smyth D, Bailey R, Cooper JD, Ribas G, Campbell RD, Clayton DG, Todd JA. Localization of type I diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 2007; 450: 887-892.
- Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 1134-1148.
- Noble JA and Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011 Dec; 11(6): 533-542.
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigar M, Kuchelapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kuchelapati R, Nishino S, Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med.* 2000; 6(9): 991-997.
- Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Gabrielli F, Di Cello TE, Anania MC, Mastracchio A, Silano M and De Vincenzi M. Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:137-140.
- Reunala T, Collin P, Holm K, Pikkarainen P, Miettinen A, Vuolteenaho N and Mäki M. Tolerance to oats in dermatitis herpetiformis. *Gut* 1998; 43: 490-493.
- Sategna-Guidetti C, Volta U, Ciacci C, Usai P, Carlino A, De Franceschi L, Camera A, Pelli A and Brossa C. Prevalence of thyroid disorders in untreated adult celiac disease patients and effect of gluten withdrawal: an Italian multicenter study. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 751-757.
- Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M: Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res.* 1998; 43: 435-441.
- Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 234-242.
- Shan, Lu, Molberg, O, Parrot, I, Hausch, F, Filiz, F, Gray, G, Sollid, L, Kohsla, C. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science* 2002; 297: 2275-2279.
- Siebold C, Hansen BE, Wyer JR et al. Crystal structure of HLA-DQ*0602 that protect against type I diabetes and confers susceptibility to narcolepsy. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004; 101: 1999-2004.
- Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 647-655.
- Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase - guilt by association? *Gut* 1997; 41: 851-852.
- Thompson G, Valdes AM, Noble JA, Kockum I, Grote MN, Najman J, Erlich HA, Cucca F, Pugliese A, Steenkiste A, Dorman JS, Caillat-Zucman S, Hermann R, Ilonen J, Lambert AP, Bingley PJ, Gillespie KM, Lernmark Å, Sanjeevi CB, Rønningen KS, Undlien DE, Thorsby E, Petrone A, Buzzetti R, Koeleman BP, Roep BO, Saruhan-Direskeneli G, Uyar FA, Günozü H, Gorodezky C, Alaez C, Boehm BO, Mlynarski W, Ikegami H, Berrino M, Fasano ME, Dometto E, Israel S, Brautbar C, Santiago-Cortes A, Frazer de Llado T, She JX, Bugawan TL, Rotter JL, Raffel L, Zeidler A, Leyva-Cobian F, Hawkins BR, Chan SH, Castano L, Pociot F and Nerup J. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type I diabetes: a meta-analysis *Tissue Antigens* 2007; 70 (2): 110-127.
- Todd JA, Bell JL, McDevitt HO. HLA-DQ gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329: 599-604.
- Undlien DE and Thorsby E. HLA associations in type I diabetes: merging genetics and immunology. *Trends Immunol.* 2001; 22 (9): 467-469.
- van de Wal Y, Kooy YM, Drijfhout JW, Amons R, and Koning F. Peptide binding characteristics of the celiac disease-associated DQ (α 1*0501, β 1*0201) molecule. *Immunogenetics* 1996; 44 (4): 246-253.
- Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA. GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest.* 2002; 109(7): 895-903.
- Volta U e Ubaldi E. La malattia celiaca in medicina generale Copyright 2009 by Pacini Editore SpA, Pisa.
- Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG and Janeway CA Jr. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med.* 1999; 5: 1026-1031.

Address correspondence to:
Attilio Fabio Cristallo MD PhD
Servizio di Immunoematologia e
Medicina Trasmfusionale
Ospedale Santa Chiara, Trento

Pervenuto il 29/10/2012

MECCANISMI D'AZIONE ED EFFETTI DEGLI ANTICORPI ANTI-HLA SULLE CELLULE DEL TRAPIANTO DI ORGANI SOLIDI

SERGIO BAROCCI*, IRIS FONTANA**, ATTILIO FABIO CRISTALLO***

*Docente di Storia dell'Immunologia, Dipartimento Scienze, Università Popolare Don Orione, Genova

**Dipartimento Trapianti - U.O. Chirurgia e Trapianto, Azienda Ospedale Università San Martino di Genova

***Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale Ospedale Santa Chiara, Trento

Riassunto

Gli allotrapianti, a causa di differenze immunologiche dovute a molecole HLA non condivise tra donatore e ricevente, provocano nell'ospite risposte immunitarie che, se non controllate da un'adeguata terapia immunosoppressiva, portano al rigetto con riduzione o perdita acuta o cronica della funzione del tessuto o dell'organo trapiantato. In assenza di tali differenze le risposte immunitarie del ricevente hanno un effetto trascurabile sulla sopravvivenza del trapianto. I rigetti, con reattività ricevente contro donatore costituiscono la complicità immunologica per eccellenza dei trapianti di organi solidi. Nella forma di rigetto acuto, soprattutto nel trapianto renale, che è il più eseguito nella pratica clinica, le reazioni immunitarie mediate principalmente da cellule T citotossiche CD8+, costituiscono il principale meccanismo effettore, sebbene in circa il 20% dei casi possano essere coinvolti anticorpi con specificità anti-HLA. Nel rigetto cronico, che rappresenta la principale causa di perdita dell'organo nel lungo termine, condizionano in maniera negativa l'esito della sopravvivenza del trapiantato oltre al danno mediato da anticorpi anti-HLA, quello indotto dai microRNA, coinvolti nello sviluppo di fibrosi, cirrosi e carcinogenesi nel trapianto e la presenza nei pazienti di anticorpi non HLA (anticorpi anti-AT1R o autoanticorpi verso antigeni organo-specifici).

Summary

Allografts due to immunological differences toward HLA molecules not shared between donor and recipient, can trigger immune responses in the host which, if not adequately controlled by immunosuppressive therapy, leading to the acute rejection or chronic rejection with loss of function of organ transplanted. In the absence of such differences the immune responses of the recipient have a negligible effect on graft survival. Rejection represents the immunological complication for excellence in solid organ transplantation. In the forms of acute rejection, especially in renal transplant (the most performed in clinical practice), the immune reactions mediated primarily by cytotoxic T cells CD8+, constitute the main effector mechanism, although in approximately 20% of cases may be involved antibodies with specificity anti-HLA. In chronic rejection, which represents the leading cause of graft loss in the long term, the presence of non HLA antibodies and microRNAs, which are involved in the development of fibrosis, cirrhosis and carcinogenesis in transplantation, negatively affect the outcome of the survival of transplanted in addition to the damage mediated by anti-HLA antibodies (anti-AT1R or autoantibodies to organ-specific antigens).

Introduzione

L'evidenza che una risposta umorale veicolata da anticorpi anti-HLA possa essere responsabile di rigetto risale ormai a molti anni fa (Barocci et al. 2007; Büchler et al, 2008; Caro-Oleas et al, 2012; Halloran et al, 1992; Mauiyyedi e Colvin, 2002; Muro M et al, 2006; Pattison et al, 1997; Slavcev, 2003; Toresan et al, 2008). Nel corso degli anni è emerso che anticorpi verso specificità diverse, diretti cioè sia contro antigeni HLA che contro antigeni non HLA presenti sull'organo trapiantato, possono essere responsabili di episodi di rigetto anticorpo-mediato (AMR, antibody mediated rejection) (Bohmig e Regele, 2003; Carter et al, 2005; Colvin, 2007; Naemi et al, 2011; Racusen et al, 2003). È soprattutto la risposta immunitaria umorale che gioca un ruolo importante nella patogenesi del rigetto AMR.

La catena degli eventi immunitari alla base della reazione di rigetto ha come protagonista le molecole HLA di classe I e II codominanti e altamente polimorfiche. Le molecole di classe I sono espresse costitutivamente dalla quasi totalità delle cellule dell'organismo e permettono l'esposizione di proteine di origine endogena (per esempio antigeni virali infettanti la cellula o cellule neoplastiche) ai linfociti T citotossici CD8+; le molecole HLA di classe II sono espresse costitutivamente solo su alcune cellule

(linfociti B, monociti, macrofagi, cellule dendritiche) e permettono la presentazione di antigeni extracellulari (per esempio i batteri) ai linfociti T helper CD4+. Questi anticorpi sono in grado di provocare gravi danni al trapianto attraverso meccanismi sia complemento-dipendenti che complemento indipendenti.

Gli alloanticorpi possono essere diretti sia contro gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I o II e/o che contro antigeni non HLA

Nel corso di quest'ultimo decennio numerosi studi hanno permesso di comprendere come la comparsa di anticorpi anti-HLA e anti-antigeni non HLA nei riceventi con trapianto di organi solidi poteva danneggiare e/o modificare la funzione del trapianto conducendo a un progressivo deterioramento cellulare (DeVos et al, 2012; Dragun, 2007; Jolly et al, 2012; Reinsmoen et al, 2010).

La descrizione delle caratteristiche istologiche delle lesioni mediate da anticorpi nei trapianti cardiaci ha messo in luce come tra i maggiori fattori di rischio per lo sviluppo dell'AMR vi fossero le gravidanze multiple, le trasfusioni di sangue, i ritrapianti, la presenza di dispositivi per l'assistenza ventricolare e le infezioni causate da citomegalovirus (Fishbein e Fishbein, 2012).

La patogenesi dell'AMR sembra soprattutto da ricondursi alla deposizione di alloanticorpi nel sistema vascolare del trapianto in seguito all'attivazione della cascata complementare, alla secrezione di citochine e ai danni che subiscono le cellule endoteliali (con conseguente infiammazione microvascolare, fenomeni di trombosi e di rimodellamento endoteliale); gli stessi alloanticorpi anti-HLA possono direttamente causare anche la proliferazione delle cellule endoteliali e lo sviluppo di una vasculopatia cardiaca da trapianto (Jin et al, 2005; Li et al, 2009; Sis et al, 2010).

Uno studio recente ha fornito una panoramica generale delle basi molecolari dell'AMR introducendo il concetto dell'abbinamento di biomarcatori molecolari con le valutazioni sierologiche degli anticorpi HLA anti-donatore (Sis, 2012): utilizzando i risultati ricavati da analisi genomiche eseguite su biopsie di trapianti renali, sono stati individuati almeno 119 trascritti endoteliali cellulo-associati (ENDAT, endothelial-associated transcripts) (Sis et al, 2009), che insieme alla presenza di anticorpi HLA donatore-specifici consentono di classificare le lesioni istopatologiche da AMR; alti scores di ENDAT e DSA (donor-specific antibodies) combinati comprendenti anche i casi di AMR C4d negativi e AMR C4d positivi possono essere in grado di predire anche pazienti a rischio futuro di fallimento del trapianto (Sis, 2012). L'upregulation dei geni ENDAT si accompagna a una serie di eventi associati all'attivazione endoteliale come il richiamo dei leucociti, effetti pro-coagulanti, l'attivazione piastrinica, l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare.

Sviluppo di anticorpi donatore-specifici e rigetto mediato da anticorpi come causa di rigetto cronico

I principali meccanismi attraverso i quali gli anticorpi possono mediare un rigetto cronico sono:

1. la fissazione del complemento;
2. l'attivazione delle cellule NK attraverso il legame tra l'FC su cellule opsonizzate da anticorpi e il CD16 (Fc gamma receptor III) che innesci l'aumento della maturazione delle cellule NK;
3. l'attivazione diretta dell'endotelio in presenza di anticorpi anti-HLA.

Utilizzando un modello murino sperimentale di trapianto di cuore, è stata dimostrata l'importanza delle cellule NK nel promuovere lo sviluppo dell'arteriosclerosi del trapianto in presenza di anticorpi MHC di classe I (Akiyoshi et al, 2012). In particolare, la deplezione di cellule NK elimina lo sviluppo di lesioni coronariche in presenza o assenza di complemento.

Questi risultati forniscono nuove conoscenze sul ruolo che svolgono le cellule NK nell'AMR.

Ruolo delle piastrine nella patogenesi dell'AMR

Gli anticorpi anti-HLA da soli o insieme al sistema complementare, provocano esocitosi del fattore di von Willebrand e della P-selectina dalle cellule endoteliali, inducendo un aumento delle interazioni tra le piastrine, i leucociti e l'endotelio. Le piastrine rispondono a loro volta agli anticorpi anti-HLA rilasciando granuli di secrezione che contengono molecole di adesione, citochine, chemochine (per esempio il Platelet factor 4), fattori di crescita che a loro volta attivano in un circolo vizioso le cellule endoteliali. Le piastrine interagiscono con i componenti del complemento in quanto portano recettori per il C1q. Tali interazioni possono incrementare la degranolazione piastrinica e facilitare le interazioni piastrine-leucociti (Kuo et al, 2012).

Meccanismi complemento indipendenti e anticorpi anti-HLA di classe I

I meccanismi complemento indipendenti che stanno alla base della patogenesi di AMR dipendono dal legame tra anticorpi anti-HLA di classe I e le corrispondenti molecole MHC bersaglio presenti sulla superficie delle cellule endoteliali: il legame provoca infatti l'attivazione e la proliferazione delle cellule endoteliali (Ziegler et al, 2012) con conseguente vasculopatia del trapianto. Le molecole HLA di classe I sono funzionalmente interconnesse con l'integrina $\beta 4$ (gli anticorpi anti-HLA innescano segnali che danno il via all'abnorme crescita delle cellule che rivestono le pareti interne dei vasi degli organi trapiantati; in tale processo è implicata l'integrina $\beta 4$; l'integrina è in grado di "dirottare" gli HLA, assumendone le funzioni; se si sopprime l'integrina, gli anti-HLA non sono in grado di stimolare la crescita cellulare) e il segnale di proliferazione cellulare HLA di classe I dipendente è regolato da numerose chinasi tra cui Src,

la chinasi di adesione focale, le chinasi PI3K/Akt e l'ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (Zhang et al, 2012). La dipendenza reciproca tra integrina $\beta 4$ e le molecole HLA di classe I per segnali trasmessi all'interno delle cellule endoteliali è importante anche nella regolazione dell'angiogenesi e nella progressione tumorale, dal momento che la migrazione delle cellule endoteliali indotta dalla laminina-5 necessita della molecola HLA di classe I.

Apoptosi delle cellule endoteliali, rigetto cronico e vasculopatia del trapianto

L'apoptosi delle cellule endoteliali, la successiva riparazione vascolare e il rimodellamento cellulare contribuiscono allo sviluppo del rigetto cronico e alla vasculopatia del trapianto (Miller et al, 2001; Zheng et al, 2011).

Il legame degli anticorpi anti-HLA induce una stimolazione della proliferazione cellulare e una up-regolazione dei geni di sopravvivenza cellulare. Gli eventi intracellulari indotti dal legame sembrano dipendere dal titolo degli anticorpi. Titoli elevati stimolano la proliferazione cellulare mentre bassi titoli attivano la via PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine kinase) e promuovono l'espressione di proteine di sopravvivenza cellulare incluse Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) e Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) (Charreau, 2012; Jin et al, 2004).

Giocano un ruolo importante e molto complesso sull'apoptosi anche molecole come il nuclear factor- κ B (NF- κ B) che regola geni anti-apoptotici, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K), effetto proliferante, la mitogen-activated protein kinases (MAPK) effetto proliferante, la Notch signaling pathway (effetto limitante l'angiogenesi per diminuzione della trascrizione del recettore per il vascular endothelial growth factor VEGF), la protein C/protease activated receptor (PAR) pathway (l'attivazione dei recettori PAR-1 stimola l'angiogenesi mentre PAR-4 inibisce il processo angiogenico promuovendo il rilascio di endostatina e diminuendo la secrezione di VEGF).

Ruolo delle cellule muscolari lisce nella fisiopatologia della vasculopatia del trapianto

Le cellule muscolari lisce vascolari (SMC) svolgono un importante ruolo nella fisiopatologia della vasculopatia del trapianto (Galvani et al, 2011). Per descrivere l'effetto proliferativo "in vitro" e "in vivo" degli anticorpi anti-HLA di classe I su cellule muscolari lisce umane è stato sviluppato un modello sperimentale con segmenti di arterie mesenteriche umane trapiantate nell'aorta di topi SCID (Severe Combined Immuno Deficiencies) in posizione sottorenale (Trayssac et al, 2012). Iniettando settimanalmente anticorpi anti-HLA di classe I è stato possibile dimostrare che il trasferimento passivo di tali anticorpi era in grado di provocare lesioni tipiche della vasculopatia del trapianto dopo sei settimane mentre topi trapiantati ma trattati con anticorpi irrilevanti non

svilupparono alcuna lesione significativa. Gli anticorpi anti-HLA "in vitro" si dimostravano mitogenici verso le SMC attraverso l'attivazione di vie di segnalazione stress-indotte che coinvolgevano delle metalloproteasi della matrice e la nSMase-2 (neutral sphingomyelinase2). Tale effetto proliferativo poteva essere bloccato dall'azione di inibitori farmacologici di queste vie o dai miRNA (Kosaka et al, 2010) (i miRNA possono indurre una rapida degradazione degli mRNA target, riducendo indirettamente la quantità di proteina prodotta; sono stati individuati almeno due modi generali di down-regulation, mediati dai miRNA, la repressione della traduzione e la degradazione dell'RNA messaggero).

Cambiamenti nel microambiente e rigetto cronico

Anche cambiamenti cellulari nel microambiente sono in grado di promuovere lo sviluppo del rigetto cronico. Infatti, insulti cellulari e umorali immunitari verso le cellule endoteliali possono contribuire al rigetto cronico attraverso la distruzione del microcircolo creando anomali flussi di sangue che favoriscono un'ipossia tissutale locale. L'ipossia tissutale locale in combinazione con le interazioni tra ligando e recettore del VEGF contribuisce al rigetto cronico per mezzo del segnale mTOR (mammalian target of rapamycin). L'attivazione e la proliferazione delle cellule endoteliali così come le interazioni VEGF-VEGF receptors richiedono un segnale intracellulare PI-3K/Akt/mTOR (Jindra et al, 2008). Si ritiene che l'mTOR possa svolgere un ruolo importante nelle vie di segnalazione che portano al rigetto cronico. L'impiego di inibitori di mTOR potrebbe prolungare la sopravvivenza del trapianto a lungo termine (Dormond et al, 2012).

Le cellule endoteliali possono attivare altre sottopopolazioni di cellule T CD4⁺ (Th17 e cellule T reg) sia verso una risposta pro-infiammatoria sia verso una risposta regolatoria. Vi sono evidenze istologiche che l'endotelio microvascolare rappresenterebbe il sito primario di danno del trapianto in quanto risulterebbe essere il primo sito di incontro con il sistema immunitario dell'ospite. La capacità di generare cellule T alloreattive può dipendere da molti fattori tra cui l'origine vascolare della cellula endoteliale, il rilascio di citochine, la presenza o l'assenza di stimoli infiammatori che comprendono anche i ligandi dei Toll-like receptors (TLRs) e gli alloanticorpi (Taflin et al, 2012).

Ruolo degli anticorpi non HLA sul trapianto di organi solidi

Esiste anche un crescente numero di dati che supporta il ruolo esercitato dagli anticorpi non anti-HLA nel rigetto acuto e cronico del trapianto di organi solidi (Bharat et al, 2010; Nath et al, 2010). Questo tipo di anticorpi è diretto contro auto-antigeni organo specifici e l'infiammazione ed il danno tissutale derivante dal riconoscimento alloimmune

sono in grado di stimolare l'immunità cellulare e umorale di auto-antigeni (Sarma et al, 2012): un confronto tra un trapianto polmonare sperimentale e un trapianto polmonare umano dimostra che il legame tra la generazione di risposte cellulari e umorali del sistema immunitario autoreattive verso gli autoantigeni Ka1 Tubulina e collagene tipo V e lo sviluppo di bronchiolite obliterante, è un segno distintivo di rigetto cronico. In particolare, l'attivazione della risposta alloimmune conduce alla generazione di cellule Th-17, alla produzione di IL-17 e all'autoimmunità verso antigeni self. Anche gli anticorpi diretti contro l'angiotensin II type I receptor (AT1R) sarebbero implicati nella patogenesi dell'AMR, accompagnata da ipertensione maligna in assenza di anticorpi anti-HLA.

Meccanismi anticorpo-mediati diretti contro bersagli non HLA correlati possono esercitare effetti negativi sulla funzionalità dell'organo trapiantato e la sopravvivenza (Zhang et al, 2007). L'AT1R (che è un G-recettore accoppiato ad una proteina che possiede 14 polimorfismi descritti che regolano il livello di espressione e la reattività dell' angiotensina II) rappresenta un bersaglio funzionale per alloanticorpi e autoanticorpi non HLA di sottoclasse IgG1 e IgG3. La rilevanza fisiopatologica degli anticorpi anti-AT1R nell'AMR nel trapianto renale è stata fornita dagli studi di trasferimento passivo in modelli animali e nel salvataggio terapeutico dei pazienti (Dragun et al, 2012). Sebbene gli anticorpi anti-AT1R appartengano alle sottoclassi IgG che fissano il complemento, la positività C4d nelle biopsie con trapianto renale non veniva spesso rilevata perché coinvolgeva meccanismi di lesione complemento indipendenti. Gli anticorpi anti-AT1R esercitano effetti diretti sull'endotelio e sulle cellule muscolari lisce vascolari mediante l'attivazione dei fattori di trascrizione attivator protein 1 (AP-1) e NF- κ B, la produzione di citochine e di fattori tissutali. Sono necessari ulteriori studi per valutare il ruolo dell' AT1R nel trapianto di organi solidi e per determinare se gli inibitori farmacologici dell'AT1R siano in grado di mitigare la disfunzione del trapianto e le relative patologie. L'introduzione di test immunoenzimatici che utilizzano estratti di cellule che sovraesprimono AT1 R nella sua conformazione nativa rappresentano utili strumenti per studi di coorti indipendenti. La valutazione dello stato degli anticorpi anti-AT1R insieme agli anticorpi anti-HLA può essere di aiuto per identificare quei pazienti a rischio di lesioni irreversibili acute o croniche del trapianto allogenico e per migliorare i risultati complessivi.

Conclusioni

Sono stati compiuti notevoli progressi nella prevenzione del rigetto acuto dopo trapianto di organo solido con conseguente miglioramento della sopravvivenza del trapianto. Tuttavia, la funzione del trapianto a lungo termine rimane ancora deludente

principalmente a causa del rigetto cronico. Allo-risposte che conducono alla formazione di anticorpi diretti contro gli antigeni di istocompatibilità del donatore specifico durante il periodo post-trapianto sono state fortemente correlate allo sviluppo di rigetto cronico. Recenti studi hanno anche dimostrato il ruolo dell'autoimmunità nella formazione di anticorpi organo-specifici diretti contro auto-antigeni tissutali nella patogenesi del rigetto cronico (Sarma et al, 2012). Queste acquisizioni sul ruolo delle risposte immunitarie cellulari e umorali verso gli auto-antigeni nella immunopatogenesi di rigetto cronico potrebbero condurre allo sviluppo di nuove strategie per la prevenzione e/o per il trattamento del rigetto cronico.

Bibliografia

- Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A, Chase CM, Farkash EA, Neal Smith R, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB. Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol* 2012; 73(12): 1226-1232.
- Barocci S, Valente U, Nocera A. Detection and analysis of HLA class I and class II specific alloantibodies in the sera of dialysis recipients waiting for a renal retransplantation. *Clin Transplant*. 2007; 21(1): 47-56.
- Bharat A, Kuo E, Saini D, Steward N, Hachem R, Trulock EP, Patterson GA, Meyers BF, Mohanakumar T. Respiratory virus-induced dysregulation of T-regulatory cells leads to chronic rejection. *Ann Thorac Surg*. 2010; 90(5): 1637-1644.
- Büchler M. Role of anti-HLA antibodies whether or not they are directed against the donor during chronic renal graft dysfunction. *Nephrol Ther*. 2008; 4 Suppl 3: S200-3.
- Böhmig G, Regele H. Diagnosis and treatment of antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int*. 2003; 16(11): 773-787.
- Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, Gentil-Govantes MÁ, Acevedo MJ, González-Roncero FM, Blanco GB, Núñez-Roldán A. Clinical relevance of anti-HLA donor-specific antibodies detected by Luminex assay in the development of rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2012; 94(4): 338-344.
- Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, Chapman CE, Matthews CJ, Cavanagh G. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37 (2): 654-657.
- Charreau B. Signaling of endothelial cytoprotection in transplantation. *Hum Immunol*. 2012; 73(12): 1245-1252.
- Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(4): 1046-1056.

- Dormond O, Dufour M, Seto T, Bruneau S, Briscoe DM. Targeting the intragraft microenvironment and the development of chronic allograft rejection. *Hum Immunol.* 2012; 73(12): 1261-1268.
- DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, Patel SJ. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int.* 2012; 82(5): 598-604.
- Dragun D. The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in renal allograft vascular rejection. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22(7): 911-914.
- Dragun D, Catar R, Kusch A, Heidecke H, Philippe A. Non-HLA-antibodies targeting Angiotensin type 1 receptor and antibody mediated rejection. *Hum Immunol.* 2012; 73(12): 1282-1286.
- Fishbein GA, Fishbein MC. Morphologic and immunohistochemical findings in antibody-mediated rejection of the cardiac allograft. *Hum Immunol.* 2012; 73(12): 1213-1217.
- Galvani S, Trayssac M, Augé N, Thiers JC, Calise D, Krell HW, Sallusto F, Kamar N, Rostaing L, Thomsen M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. A key role for matrix metalloproteinases and neutral sphingomyelinase-2 in transplant vasculopathy triggered by anti-HLA antibody. *Circulation* 2011; 124(24): 2725-2734.
- Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992; 53(3): 550-555.
- Jindra PT, Jin YP, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol.* 2008; 180(4): 2357-2366.
- Jin YP, Fishbein MC, Said JW, Jindra PT, Rajalingam R, Rozengurt E, Reed EF. Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells. *Hum Immunol.* 2004; 65(4): 291-302.
- Jin YP, Jindra PT, Gong KW, Lepin EJ, Reed EF. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation* 2005; 79(3 Suppl): S19-21.
- Jolly EC, Key T, Rasheed H, Morgan H, Butler A, Pritchard N, Taylor CJ, Clatworthy MR. Preformed donor HLA-DP-specific antibodies mediate acute and chronic antibody-mediated rejection following renal transplantation. *Am J Transplant.* 2012; 12(10): 2845-2848.
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 2010; 285 (23): 17442-17452.
- Kuo HH, Morrell CN, Baldwin WM 3rd. Alloantibody induced platelet responses in transplants: potent mediators in small packages. *Hum Immunol.* 2012; 73(12): 1233-1238.
- Li F, Atz ME, Reed EF. Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy-mechanisms and pathways. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21(5): 557-562.
- Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; 11(6): 609-618.
- Miller LW, Granville DJ, Narula J, McManus BM. Apoptosis in cardiac transplant rejection. *Cardiol Clin.* 2001; 19(1): 141-154.
- Muro M, Llorente S, González-Soriano MJ, Minguela A, Gimeno L, Alvarez-López MR. Preformed donor-specific alloantibodies (DSA) detected only by luminex technology using HLA-coated microspheres and causing acute humoral rejection and kidney graft dysfunction. *Clin Transpl.* 2006: 379-383.
- Naemi FM, Ali S, Kirby JA. Antibody-mediated allograft rejection: the emerging role of endothelial cell signalling and transcription factors. *Transpl Immunol.* 2011; 25(2-3): 96-103.
- Nath DS, Basha HI, Mohanakumar T. Antihuman leukocyte antigen antibody-induced autoimmunity: role in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15(1): 16-20.
- Pattison JM, Sibey RK and Krenskly AM. Mechanism of allograft rejection. In *Immunologic Renal Diseases*. Philadelphia, Lippicott-Raven Publishers, 1997, 331-354.
- Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsicker L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickleleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003; 3(6): 708-714.
- Reinsmoen NL, Lai CH, Heidecke H, Haas M, Cao K, Ong G, Naim M, Wang Q, Mirocha J, Kahwaji J, Vo AA, Jordan SC, Dragun D. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation* 2010; 90(12): 1473-1477.
- Sarma NJ, Tiriveedhi V, Angaswamy N, Mohanakumar T. Role of antibodies to self-antigens in chronic allograft rejection: potential mechanism and therapeutic implications. *Hum Immunol.* 2012; 73(12): 1275-1281.
- Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in

kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009; 9(10): 2312-2323.

Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Baldwin WM 3rd, Bracamonte ER, Broecker V, Cosio F, Demetris AJ, Drachenberg C, Einecke G, Gloor J, Glotz D, Kraus E, Legendre C, Liapis H, Mannon RB, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Rodriguez ER, Seron D, Seshan S, Suthanthiran M, Wasowska BA, Zachary A, Zeevi A. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10(3): 464-471.

Sis B. Endothelial molecules decipher the mechanisms and functional pathways in antibody-mediated rejection. *Hum Immunol*. 2012; 73(12): 1218-1225.

Slavcev A. Donor-specific antibodies and kidney transplant rejection. *Ann Transplant*. 2003; 8(3): 12-15.

Taflin C, Charron D, Glotz D, Mooney N. Regulation of the CD4+ T cell allo-immune response by endothelial cells. *Hum Immunol*. 2012; 73(12): 1269-1274.

Toresan R, Manfro RC, Proença MC, Veronese FJ, Salim PH, da Silva DM, Ribeiro AR, Edelweiss MI, Pegas KL, Jobim LF. Association between the presence of anti-HLA antibodies with acute

rejection and chronic allograft nephropathy in the first year after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2008; 40(3): 718-719.

Trayssac M, Nègre-Salvayre A, Thomsen M. Mechanisms of human smooth muscle cell proliferation and transplant vasculopathy induced by HLA class I antibodies: in vitro and in vivo studies. *Hum Immunol*. 2012; 73(12): 1253-1260. Zhang G, Wang H, Wang F, Yu L, Yang X, Meng J, Qin W, Wu G, Li J, Yang A, Zhou Y, Zhang R. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal rejection. *Tohoku J Exp Med*. 2007; 213(3): 203-214.

Zhang X, Reed EF. HLA Class I: An unexpected role in integrin $\alpha 4$ signaling in endothelial cells. *Hum Immunol*. 2012; 73(12): 1239-1244.

Zheng Q, Liu S, Song Z. Mechanism of arterial remodeling in chronic allograft vasculopathy. *Front Med*. 2011; 5(3): 248-253.

Ziegler ME, Jin YP, Young SH, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I-mediated stress fiber formation requires ERK1/2 activation in the absence of an increase in intracellular Ca^{2+} in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 303(8): C872-82.

Address correspondence to:

Prof. Sergio Barocci

Via A. Robino 87/8, 16142 Genova

Pervenuto il 15/01/2013

TURNAROUND TIME (TAT): EVOLUZIONE CLINICO GESTIONALE

ELENA COSTA*, STEFANO PAINI**, MASSIMILIANO M. CORSI ROMANELLI***

*Struttura Complessa Laboratorio di Patologia Clinica – Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura – Medicina di Laboratorio, Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato, Milano.

**Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Professioni Sanitarie Tecniche Diagnostiche, Università degli Studi di Milano.

***Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Cattedra di Patologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano.

Summary

Four criteria describe laboratory quality. Among them, greater attention has been given to timeliness which is determined by turnaround time (TAT). Laboratorists are expected by physicians to give fast TATs. Often physicians use to judge laboratory quality only by TAT, marking out extremely long TATs while “forgetting” acceptable ones. Physicians claims also a correlation between prolonged TATs and health cost and lenght of stay (LOS). Such a situation, led to point of care testing (POCT) machinery use improvement since early 2000s despite augmented costs, decreased precision and higher mistakes likelihood. A better TAT it’s a difficult task laboratories have to pursue in order to strengthen their quality and services. This essay is a review of studies made to look for useful tools to measure and evaluate TAT and the efforts made to improve it.

Sommario

Il turnaround time (TAT) è misura della puntualità del laboratorio di analisi che, assieme a precisione accuratezza ed autenticità è indice di qualità nella struttura. I clinici hanno aspettative elevate verso i laboratoristi e valutano il lavoro del laboratorio basandosi sul TAT. Tra clinici e laboratoristi è spesso presente contesa riguardo alla puntualità di laboratorio ed i primi tendono a mostrare insoddisfazione nell’operato del laboratorio analisi, associando a TAT prolungati maggiori costi per la struttura sanitaria allungando il Length of Stay (LOS) del paziente e sottolineando i casi di TAT eccessivamente prolungati “dimenticando” tutti i casi in cui i TAT vengono riportati in tempi accettabili. Questa insoddisfazione, ha spinto a cercare soluzioni per ridurre il TAT, portando ad esempio nell’ultimo decennio allo sviluppo dei Point of Care Testing (POCT).

Migliorare il TAT, invariato per decenni, è un compito difficile cui la gestione dei laboratori è chiamata a lavorare per poter implementare i servizi del laboratorio. Nel corso del seguente testo si riportano i principali strumenti da utilizzare per rilevare il TAT e gli sforzi principali che sono stati fatti per poterlo ridurre e per arrivare a tempi di refertazione accettabili.

Introduzione

Definizione e controversie

Il turnaround time (TAT) è il lasso temporale che intercorre tra il momento in cui una richiesta d’esame viene somministrata al laboratorio ed il momento in cui questo viene refertato al clinico richiedente (Negri et al, 1998).

Il TAT è la misura della tempestività di laboratorio ed il suo monitoraggio è richiesto per l’ottenimento della certificazione ISO 15189:2007 (Hawkins, 2012).

Lundberg suddivide il TAT in nove passaggi contenuti in tre fasi distinte del processo, introducendo il “total testing process” (TTP) [figura.1] (Hawkins, 2007; Lundberg, 1981).

Benché il TTP sia condiviso, tra clinici e laboratoristi è presente una diatriba riguardante l’effettiva porzione di TAT da misurare: mentre i clinici indi-

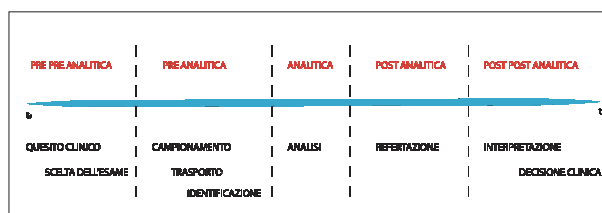


Figura.1: Rappresentazione grafica della divisione di Lundberg del TTP. Da t0 a t1 vengono rappresentati i nove steps che, secondo la visione dell'autore, rappresentano il TTP. Le tre fasi che lui identifica sono la pre-analitica, l'analitica e la post-analitica, le due fasi estreme (pre-pre, post-post) sono state inserite a posteriori da altri autori (Laposata et al, 2007) per marcare la differenza tra ambiente interno ed esterno al laboratorio. Su questa divisione clinici e laboratoristi spostano t0 e t1 a seconda della visione personale: i paletti di inizio e fine TAT vengono posti in punti diversi della linea. Questo non giova al confronto tra laboratori e figure professionali. Immagine realizzata dagli autori dell'articolo.

cano come t , il momento della richiesta dell'esame, e come t_1 la decisione terapeutica (TAT-terapeutico); molti laboratoristi segnano confini più ristretti con il TAT-intralaboratorio escludendo quelle fasi che non sono prettamente analitiche (Hawkins, 2007) ritenendole lontane dall'ambiente di laboratorio.

Il TAT-intralaboratorio non ha confini ben definiti in quanto vi è disaccordo sul momento d'inizio e fine dello stesso, creando difficoltà nella valutazione e nel confronto fra strutture diverse.

Queste differenze sono ben rappresentate in una review presente in letteratura: è emerso che sono state pubblicate 61 diverse definizioni complete. Non tutte queste si riferiscono al laboratorio, l'autore le suddivide in cinque categorie, e per il laboratorio ne ha evidenziate 19 (Bernhard et al, 2011). La definizione più comune, riportata da 25 articoli, è quella che comprende il TAT tra l'arrivo del campione in laboratorio e la disponibilità del risultato visionabile dal clinico. Una visione più complessiva, dalla richiesta alla disponibilità, viene riportata da 9 articoli.

Ridurre il TAT

Per ridurre il TAT è necessario assimilarlo come strategia e che ad esso vengano dedicate attenzione e risorse. È parimenti importante che lo staff di laboratorio sia motivato ed addestrato adeguatamente visto il protrarsi nel tempo dei programmi che comprendono a volte la realizzazione di obiettivi contestuali.

Una linea guida viene presentata da Howanitz. L'autore suggerisce di partire dalla bibliografia per la ricerca degli strumenti da utilizzare; di effettuare un'attenta analisi interna alla propria condizione in cui si presenta il TTP e di analizzare ogni passaggio delle fasi, investigando il modello che meglio si adatta alla situazione in esame (Howanitz, 2005).

Analisi Statistica

Per analizzare i TAT e poterli confrontare tra diverse strutture i dati ottenuti tramite le misurazioni vengono sottoposti ad analisi statistica utilizzando media, mediana e ampiezza della coda (Valenstein, 1989), essendo la distribuzione dei dati tipo non Gaussiano con asimmetria positiva.

È opportuno considerare anche un altro indicatore: la percentuale dei report "outlier" ovvero i casi che eccedono un tempo TAT definito (TAT-OP, Turnaround Time-Outlier Percentage). Questo indicatore viene considerato migliore per il confronto fra laboratori, in quanto la media può talvolta essere fuorviante [figura.2] (Lorne et al, 2005). La media è da prediligere in caso di laboratori che, pur avendo già una buona performance, vogliano migliorarla.

La disposizione grafica dei dati misurati aiuta il processo di analisi: gli outlier possono venire quan-

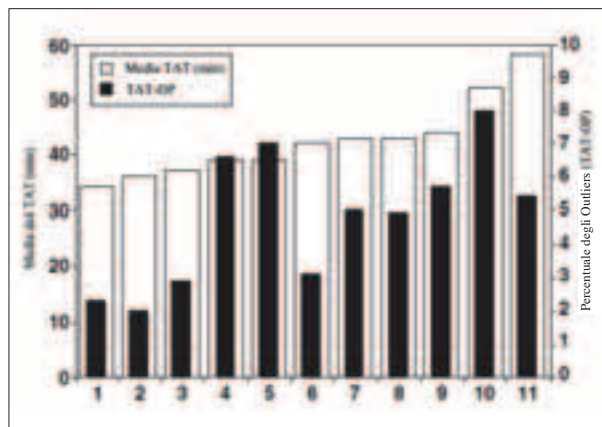


Figura. 2: Grafico che compara le medie dei TAT e le TAT-OP degli undici ospedali in esame. L'autore pone l'attenzione sulle casistiche 6-9 che, pur avendo medie sovrapponibili, mostrano TAT-OP diverse. Il grafico è tratto e modificato dal lavoro di Lorne et al "Reducing Laboratory Turnaround Time Outliers Can Reduce Emergency Department Patient Length of Stay" Am. J Clin Pathol 2005; 124:672-674.

tificati dall'area della coda che forma il grafico. Inoltre, questa può essere utilizzata anche per ottenere il tempo in cui un dato percentile della distribuzione è compreso e viene chiamato "the 90% completion time" (tempo in cui vengono evase il 90% delle richieste); viene utilizzato anche il 95%.

Interventi di miglioramento

Root Cause Analysis (RCA)

La root cause analysis (RCA) è una tecnica investigativa che viene presa in prestito dall'ingegneria. Tramite il suo utilizzo è possibile individuare le cause (root = radice) che hanno portato al manifestarsi di un evento critico. Questo modello è valido ed utile per tutte le fasi del TTP (Fernandes et al, 2004) ed ha il vantaggio di evidenziare possibili soluzioni durante l'analisi e permette di affrontare con oggettività il problema.

Sono tre le fasi sequenziali da adottare nel processo di analisi: 1) identificazione delle potenziali cause tramite un diagramma causa-effetto; 2) raccolta dei dati relativi alle cause identificate; 3) identificazione delle vere cause "radice".

Un esempio di utilizzo della RCA è quello di Fernandes et al, dove sono state analizzate le cause che portavano a TAT prolungati (Fernandes et al, 1997).

Fase Preanalitica

Il Metodo di Trasporto

In uno studio del 2006 (Fernandes et al, 2006) gli autori hanno messo a confronto il trasporto di campioni di sangue fatto da un corriere rispetto al trasporto effettuato tramite sistema pneumatico utilizzando puntualità e qualità dei risultati delle

analisi, come indicatori. Dallo studio è emerso che il trasporto dei campioni mediante sistema pneumatico non influisce negativamente sulla qualità dei risultati mentre incide positivamente sul TAT, riducendolo sensibilmente (Steige et al, 1971).

Riorganizzazione delle Risorse

Esempi interessanti di riorganizzazione delle risorse arrivano dai lavori che utilizzano metodiche tipiche della produzione seriale.

La rimozione dello scarto fa riferimento ai principi della lean production (produzione snella) che ha come obiettivo quello di rimuovere da un processo, di qualsiasi natura, tutti i fattori che rappresentano un consumo di risorse senza incidere sul prodotto finito. Questi fattori sono identificati come "scarto".

Nella realtà di laboratorio, quest'ottica può essere utilizzata per ridisegnare flussi di lavoro appesantiti dallo scarto: Persoon et al. utilizzano questa tecnica per snellire la fase pre-analitica. Nel processo ante rimozione dello scarto, in caso di richiesta incompleta, il lavoro del tecnico in accettazione veniva bloccato dall'attività di recupero delle informazioni mancanti; nel processo ridisegnato invece le richieste incomplete vengono inoltrate ad un tecnico che ha la funzione di reperire i dati omessi. In questo caso lo scarto eliminato è composto dall'attesa, l'ispezione e la correzione della richiesta (Persoon et al, 2006).

Lo stesso lavoro, si avvale del sistema produttivo Toyota e da esso preleva l'alto livello di standardizzazione dei tempi e la sequenzialità della centrifugazione, stabilendo posizioni precise delle provette nei bussolotti (a seconda della necessità di effettuare aliquote o meno) ed impostando una centrifugata ogni 6 minuti, a prescindere dalla quantità di campioni.

Il riordino, ha avuto come conseguenza positiva la riduzione del TAT ed il raggiungimento di uno status quo, tale da non distinguere i campioni urgenti da quelli di routine.

Inserimento informatico

L'utilizzo dei sistemi informatici in laboratorio (LIS), ai quali sono interfacciati gli strumenti, può essere coadiuvato in fase pre-analitica dall'inserimento informatico delle richieste tramite i Computerized Provider Order Entry (CPOE) (Jason et al, 2011). I CPOE permettono di ridurre il TAT tramite la riduzione degli errori legati all'interpretazione della richiesta o a sviste ed alla diminuzione di richieste ridondanti, o inutili, al laboratorio. Grazie al sistema CPOE è stata riportata una riduzione del TAT dei test di laboratorio urgenti da 148 a 74 minuti (Thompson et al, 2004).

Point of Care Testing (POCT)

I POCT, coadiuvati dalla forte voglia di avere TAT

ridotti, hanno avuto una notevole espansione dai primi anni 2000 e rappresentano un fattore che influisce positivamente sul TAT. I loro vantaggi vengono riportati da Drenck: 1) velocità di esecuzione (data da due fattori: generalmente i POCT utilizzano sangue intero saltando la preparazione, e il trasporto al laboratorio non viene effettuato); 2) riduzione degli errori in fase pre-analitica (artefatti dovuti al trasporto, l'identificazione del paziente, esecuzione di esami non richiesti). Tra gli svantaggi vengono riportati il possibile collegamento assente tra POTC e sistemi informatici (causando la perdita o la disseminazione dei dati nei vari reparti); i costi, potenzialmente aumentati a causa del prezzo della nuova strumentazione e delle analisi, a prezzo fisso non ammortizzato dalle grandi quantità di un laboratorio centrale; l'accuratezza che non risulta ottimale e la manipolazione del materiale da parte di personale non opportunamente addestrato può portare ad errori in fase analitica (Drenck, 2001).

L'utilizzo dei POTC è consigliato come supporto al laboratorio centrale e non come suo sostituto.

Fase Analitica

L'elemento principale che caratterizza gli sforzi per ridurre il TAT intaccando la fase analitica è l'automazione.

Nel 2006 si è cercato di ridurre il TAT intralaboratorio, dopo aver osservato dei LOS prolungati per gli esami outlier (ovvero gli esami refertati oltre un dato tempo limite). L'intervento correttivo è stato identificato nell'introduzione di nuove apparecchiature automatizzate per l'analisi dei tre analiti in studio, (potassio, troponina-I, tireotropina) con presenza di unità in grado di rimuovere e riapplicare il tappo delle provette. Il processo di validazione è stato implementato da software interfacciati agli strumenti in grado di scremare i referti tramite meccanismi di auto validazione basati sull'utilizzo di programmi ad alta funzionalità decisionale.

Lo studio ha evidenziato che il processo di automazione impatta positivamente sul TAT-intralaboratorio (Lorne et al, 2006).

Tuttavia l'automazione, non è l'unica soluzione: Chien mostra come la riprogettazione del flusso di lavoro di laboratorio sia stata in grado di ridurre di 18 minuti il tempo di refertazione della troponina-I (passando da 66 a 48 minuti), anche a fronte di un aumentato carico di lavoro per il laboratorio stesso (Chien et al, 2007).

Fase Postanalitica

La fase post-analitica beneficia della presenza dei sistemi informatici: Bruins et al. nel 2011 si approciano a questa fase nel settore della microbiologia con lo scopo di accorciare il TAT agendo sulla refertazione. Richiedendo la coltura dei batteri più giorni di osservazione, si effettuano refertazioni

intermedie che vengono comunicate al clinico per via telefonica o per via cartacea.

La refertazione cartacea risulta essere lenta contrariamente a quella via telefono che è però incline a diversi errori legati maggiormente alla sfera della comunicazione: l'informazione può essere male interpretata o espressa, o non riportata sulla cartella clinica.

La proposta di miglioramento degli autori è stata quella di sfruttare il sistema informatico già presente nella struttura ospedaliera per rendere disponibili i risultati ai clinici ed al personale autorizzato. Dopo un anno gli autori hanno predisposto un'intervista semi-strutturata a 13 clinici operanti nella struttura, che hanno dimostrato soddisfazione, inoltre sono stati riscontrati vantaggi anche sul laboratorio: le telefonate da parte dei clinici che interpellavano lo staff di laboratorio sullo stato dei campioni, sono diminuite.

Conclusioni

La definizione variegata del TAT si riflette nel suo management, che copre tutte le fasi del TTP.

Le diverse fasi hanno avuto grandi evoluzioni grazie ad interventi sia specifici che più ampi.

La fase pre-analitica, ad esempio, di intervento specifico, nel corso degli anni ha avuto sostanziali migliorie grazie all'implementazione di sistemi di trasporto più veloci. Attualmente i sistemi di trasporto pneumatici vengono utilizzati con successo e forniscono ottimi risultati a livello di tempistica, che non impattano sulla integrità del campione. Naturalmente questa tipologia di trasporto è legata all'architettura ed alla posizione del laboratorio centrale rispetto al punto prelievi.

La fase analitica ha beneficiato dell'automazione e dell'ingresso di nuove tecnologie che hanno permesso di ridurre notevolmente i TAT.

Pur rimanendo validi gli interventi mirati, azioni più ampie sul TTP risultano più complete ed hanno il vantaggio di ridurre il TAT in diversi punti.

Gli strumenti a disposizione che meglio si prestano a questo approccio sono quelli che utilizzano risorse già presenti nel laboratorio, agendo sulla loro riorganizzazione: l'utilizzo della RCA, della lean production e dei sistemi produttivi Toyota, ha permesso di ottenere risultati importanti senza costi aggiuntivi per la struttura.

Un'altra strada per la riduzione del TAT è lo studio di nuovi protocolli: in uno studio recente vengono messi in discussione i protocolli comunemente utilizzati di centrifugazione: gli autori passano dalla centrifugazione raccomandata dall'OMS (10 minuti per il siero e 15 minuti per il plasma a 2000-3000g) a 5 minuti a 1885g (Koenders et al, 2012). I risultati dello studio sono incoraggianti in quanto viene dimostrato che il risultato analitico nei campioni di siero non cambia se non per i valori lipemici che risultano più elevati (dovuto da una non

completa migrazione dei chilomicroni). Per i campioni di plasma il trend è stato analogo, pur apportando correzioni dovute all'indice lipemico aumentato.

Questo nuovo protocollo ha portato alla riduzione di 11 minuti sul TAT totale.

L'utilizzo e l'implemento dei sistemi informatici gioca un ruolo importante nella gestione del TAT in quanto ha la possibilità di interconnettere le fasi del TTP e gli attori presenti in ciascuna di esse.

Il TAT è da considerarsi comunque legato allo sviluppo di nuove tecnologie che possano permettere di ridurlo ulteriormente.

I POCT nascono per avere risultati rapidi, pur risultando molto veloci non garantiscono risultati precisi ed accurati (Nørgaard et al, 2012). Queste caratteristiche rendono i POCT un sistema che può essere utilizzato come supporto al laboratorio; è recente lo studio che utilizza i Rapid Diagnostic Tests e i POCT in supporto al laboratorio centrale per gli screening in virologia (HCV) (Shivkumar et al, 2012).

Una maggiore implementazione dei supporti informatici, specialmente nel campo della formulazione delle richieste tramite CPOE, è auspicabile vista la prevalenza relativamente bassa di utilizzo: nel 2007 solamente il 10% dei laboratori statunitensi era vantaggiato dal sistema CPOE (Sittig et al, 2007). Nel report del 2009 la situazione presentata dall'Olanda riportava un utilizzo del CPOE del 20% e stimava un utilizzo nel Regno Unito in Germania inferiore al 2% (Aarts, 2009).

La maggior parte degli studi presenti in letteratura pur rappresentando esempi concreti e positivi di management del TAT, sottolineano le difficoltà nel raggiungere i goal prefissati, a causa delle tempistiche prolungate e di una definizione di TAT non ancora condivisa.

Referenze

- Aarts J. Implementation of computerized physician order entry in seven countries. *Health Aff (Milwood)* 2009; (28): 404-14.
- Bernhard B, Fritz F, Thiemann V, Dugas M. Mapping Turnaround Times (TAT) to a Generic Timeline: A Systematic Review of TAT Definitions in Clinical Domains. *BMC Medical Informatics and Decision Making* 2011, 11: 34.
- Bruins MJ, Gijs JHM Ruijs, Wolfhagen Maurice JHM, Bloembergen P, Aarts J. Does electronic clinical microbiology results reporting influence medical decision making: a pre- and post-interview study of medical specialists. *BMC Medical Informatics and Decision Making* 2011, (11): 19.
- Chien TI, Lu JY, Kao JT, Cheng YC, Lee YF. Evaluation and improvement strategy of analytical turnaround time in the stat laboratory. *J Formos Med Assoc.* 2007 Jul; 106(7): 558-64.
- Drenck N. Point of care testing in Critical Care

- Medicine: the clinician's view. *Clin Chim Acta* 2001; (307): 3-7.
- Fernandes C, Worster A, Eva K, Hill S, McCallum C. Pneumatic Tube Delivery System for Blood Samples Reduces Turnaround Times Without Affecting Sample Quality. *Journal of Emergency Nursing* 2006; 32(2): 139-143.
- Fernandes C, Worster A, Hill S, McCallum C, Eva K. Root cause analysis of laboratory turnaround times for patients in the emergency department. *Can J Emerg Med* 2004; 6(2): 116-22.
- Fernandes C, Walker R, Price A, Marsden J, Haley L. Root cause analysis of laboratory delays to an emergency department. *Journal of Emergency Medicine* 1997; (15): 735-739.
- Hawkins R. Managing the Pre- and the Post-analytical Phases of the Total Testing Process. *Ann Lab Med* 2012; (32): 5-16.
- Hawkins R. Laboratory Turnaround Time. *Clin Biochem Rev* 2007; (28): 179-194.
- Howanitz PJ. Errors in Laboratory Medicine Practical Lessons to Improve Patient Safety. *Arch Pathol Lab Med* 2005; (129).
- Jason M, Anand S, Dighe. Computerized provider order entry in the clinical laboratory. *J Pathol Inform* 2011, (2): 35.
- Koenders MM, van Hurme ME, Glasmacher-Van Ziji M, van der Linde G, Westerhuis BW. The analytic impact of a reduced centrifugation step on chemistry and immunochemistry assays: an evaluation of the Modular Pre-Analytics. *Ann Clin Biochem* 2012; (49): 468-474.
- Laposata M and Dighe A. "Pre-pre" and "post-post" analytical error: high-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2007; (45): 712-9.
- Lorne L, Holland, Linda L, Smith, Kenneth E, Blick. Total Laboratory Automation Can Help Eliminate the Laboratory as a Factor in Emergency Department Length of Stay. *Am J Clin Pathol* 2006; (125): 765-770.
- Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *JAMA* 1981; (245): 1762-3.
- Negri M, Carraro P, Caenaro G, Cappelletti P, Giavarina D, Mezzena G, Prandini B, Rampoldi E, Siviero F. External Quality Assessment of Stat Test Intralaboratory Turnaround Time. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(11): 867-870.
- Nørgaard B, Mogensen CB. Blood sample tube transporting system versus point of care technology in an emergency department; effect on time from collection to reporting? A randomised trial. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012 Oct 8; (20): 71.
- Persoon TJ, Zaleski S, Frerichs J. Improving preanalytic processes using the principles of lean production/Toyota Production system. *Am J Clin Pathol* 2006; 125 (1): 16-25.
- Shivkumar S, Peeling R, Jafari Y, Joseph L, Pant Pai N. Accuracy of Rapid and Point-of-Care Screening Tests for hepatitis C: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012 Oct 16; 157(8): 558-66.
- Sittig DF, Guappone K, Campbell EM, Dykstra RH, Ash JS. A survey of USA acute care hospitals' computer-based provider order entry system infusion levels. *Stud Health Technol Inform* 2007; (129): 252-6.
- Steige H, Jones J. Evaluation of pneumatic tube systems for delivery of blood specimens. *Clin Chem* 1971; (17): 1160-4.
- Thompson W, Dodek PM, Norena M, Dodek J. Computerized Physician order entry of diagnostics tests in an intensive care unit is associated with improved timeliness of service. *Crit Care Med* 2004; (32): 1306-9.

Address correspondence to:

Prof. Massimiliano M. Corsi Romanelli, MD PhD,
Servizio di Medicina di Laboratorio 1- Patologia
Clinica (Blocco C, Piano 1°), I.R.C.C.S. Policlinico
San Donato, P.zza Edmondo Malan n. 2,
20097 San Donato Milanese, Milano.

Pervenuto il 24/01/2013

IL VALORE PROGNOSTICO DELLA TROPONINA T IN PAZIENTI EMODIALIZZATI

TRINCHESE GIOVANNI, FEDELE SALVATORE, NAPOLITANO LEONARDO ANTONIO*

*S.C. di Patologia Clinica - Ospedale S. Maria della Pietà - Nola (NA).

Summary

Patients on long-term hemodialysis have a high cardiovascular mortality. Cardiac troponin T, cTnT, specific marker for myocardial damage, have a high prevalence in asymptomatic patients with chronic renal failure. Remains unclear the role of cTnT in patients with renal disease. We evaluated the clinical utility of cardiac cTnT as a marker of acute myocardial infarction (AMI) in hemodialysis patients.

Introduzione

I miglioramenti tecnici e farmacologici hanno aumentato le aspettative di vita dei pazienti con grave insufficienza renale ma nonostante ciò, le prospettive a lungo termine sono ancora gravate da una alta morbilità e mortalità cardiovascolare che è ben 10-20 volte più alta rispetto alla popolazione generale (Foley et al, 1998).

L'infarto del miocardio è una frequente e seria complicazione in questi pazienti (Martin et al, 1998) e diversi markers biochimici nel tempo sono stati proposti per valutarne la prognosi e la diagnosi.

Le troponine cardiache attualmente sono considerate i markers di prima scelta per la diagnosi di danno del miocardio in pazienti con malattie ischemiche del cuore (Hartmann et al, 1998). In alternativa alle troponine, CK-massa e Mioglobina possono essere usati come markers di seconda scelta (Collinson et al, 1998).

Nonostante l'alta efficienza di questi analiti, i loro livelli nel torrente circolatorio possono risultare aumentati nei soggetti con un danno renale (Martin et al, 1998). Ciò potrebbe far insorgere una confusione diagnostica allorché in questi pazienti si evidenziassero segni clinici di un presunto infarto cardiaco (Keiko et al, 2004).

Siamo andati a valutare la presenza di analiti specifici per la condizione di infarto del miocardio in un gruppo di pazienti che per la loro condizione clinica, si sottoponevano ad un regime dialitico ed in un altro gruppo di pazienti che erano aggravati anche dalla patologia diabetica.

Materiale e Metodo

Lo studio è stato condotto per un periodo di sei mesi su due gruppi di pazienti provenienti dall'U.O.C. di Nefrologia dell'Ospedale di Nola. Un

primo gruppo composto da 29 pazienti dializzati, un secondo gruppo che comprendeva 20 pazienti dializzati e diabetici. L'età dei pazienti oscillava tra 35 e 70 anni con una maggiore presenza di soggetti maschi. La determinazione quantitativa in vitro della cTnT, della CK MB massa, della Mioglobina, effettuata sul siero dei pazienti, dopo prelievo ematico e centrifugazione della provetta, è stata ricercata con metodica di misura in elettrochemiluminescenza (ECL) su sistema "Modular Analytics E170" della Roche. I valori di riferimento degli analiti ricercati per la cTnT sono i seguenti: <0.030 ng/ml risultato negativo, >0.030 ng/ml risultato positivo; per la CK MB massa un valore < 72 ng/ml risulta negativo nei maschi, < 58 ng/ml risulta negativo nelle donne; per la Mioglobina un valore compreso tra 0,00 - 6.73 ng/ml è negativo per i maschi, tra 0,00 - 3,77 ng/ml è negativo nelle donne.

Risultati

I nostri dati dicono che per quanto riguarda gli analiti CK MB massa e Mioglobina non vi è alcuna oscillazione oltre il valore soglia in ambedue i gruppi di pazienti analizzati (dati non mostrati).

Per quanto riguarda la cTnT è stato rilevato un aumento oltre il valore soglia con percentuali differenti nei due gruppi presi in considerazione (tabella 1).

Il follow-up, durato sei mesi, ha mostrato come nei pazienti con cTnT elevata, sia sopraggiunto un evento infartuale nel 38% dei pazienti dializzati, e nel 60% del gruppo di pazienti che presentavano anche la comorbilità diabetica. (tabella 2).

Nei pazienti, invece in cui la cTnT non si era mossa oltre il valore soglia, non era sopraggiunto in ambedue i gruppi nessun episodio infartuale (tabella 3).

PREVALENZA DI cTnT SOTTO E SOPRA IL CUT-OFF NEI VARI GRUPPI – Tab. 1

GRUPPO	TOTALE	cTnT > 0.03	cTnT < 0.03
TUTTI	49	13	36
DIALIZZATI	29	8 (28%)	21 (72%)
DIABETICI e DIALIZZATI	20	5 (25%)	15 (75%)

FOLLOW-UP SOGGETTI cTnT POSITIVI – Tab. 2

GRUPPO	TOTALE	INFARTO cTnT > 0.03	NO INFARTO cTnT > 0.03
TUTTI	13	6 (46%)	7 (54%)
DIALIZZATI	8	3 (38%)	5 (62%)
DIABETICI e DIALIZZATI	5	3 (60%)	2 (40%)

FOLLOW-UP SOGGETTI cTnT NEGATIVI – Tab. 3

GRUPPO	TOTALE	INFARTO cTnT < 0.03	NO INFARTO cTnT < 0.03
DIALIZZATI	21	0	21
DIABETICI e DIALIZZATI	15	0	15

Discussione

La prevalenza, l'eziologia e il significato clinico di alti titoli di cTnT, nel siero di pazienti con gravi insufficienze renali non sono ancora stati ben definiti. È acclarato oramai che la cTnT risulta essere in pazienti con una sindrome coronarica acuta, in assenza di malattie renali, un ottimo indicatore diagnostico e prognostico (Stubbs et al, 1998).

Sappiamo anche che nei pazienti emodializzati la prevalenza d'ischemie cardiache è 10 – 20 volte maggiore rispetto alla popolazione generale con un tasso di mortalità del 50% (Peetz et al, 2003).

Negli emodializzati i sintomi clinici di danno cardiaco sono difficilmente diagnosticabili in quanto è di comune riscontro una elevazione dei valori della cTnT anche in assenza di un danno ischemico al miocardio (Mockel et al, 1999). Anche se le cause di questo fenomeno non sono state ancora definitivamente chiarite alcune ipotesi fatte parlano di una probabile repressione di isoforme cardiache a livello dei muscoli scheletrici, di una perdita dell'integrità della membrana con conseguente continuo out flow della troponina dal citosol, di un danno diretto sulle cellule miocardiche legato all'uremia.

Con questo studio siamo andati a valutare il comportamento analitico di tre specifici enzimi di danno cardiaco in soggetti sottoposti ad un regime dialiti-

co e in soggetti dializzati e diabetici per valutarne il possibile ruolo prognostico. I nostri dati se pur limitati ad un numero esiguo di pazienti controllati per un periodo di sei mesi ci dicono che Mioglobina e CK MB massa non hanno alcuna valenza prognostica nei due gruppi da noi analizzati.

Abbiamo riscontrato invece un aumento del 28% dei valori sierici della cTnT nel gruppo dei soggetti dializzati e del 25% nel gruppo dei pazienti che soffrivano anche di diabete. Durante il follow-up, nel gruppo dei dializzati con cTnT alta, si sono verificati episodi di infarto nel 40% dei soggetti, addirittura si è raggiunto il 60% nei pazienti del secondo gruppo. Questi nostri dati ci inducono a confermare la validità prognostica della sola cTnT quale predittore di sopravvivenza in questi pazienti (Stolear et al, 1999), tale capacità si amplifica qualora alla condizione di insufficienza renale cronica si associa un cofattore che ne aumenta il rischio cardiovascolare come il diabete. Nei soggetti dializzati andrebbe quindi implementato l'utilizzo di questo test per una più precoce identificazione di quei pazienti con un più alto rischio cardiovascolare, ed attuare giuste ed appropriate strategie cliniche per prevenire quegli incidenti cardiovascolari che potrebbero compromettere il loro già complicato e delicato percorso dialitico.

Bibliografia

Collinson P. Troponin T or Troponin I or CK MB (or none)? Eur Heart J 1998 19 suppl 16-17.

Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Am J Kidney Dis 1998 32: Suppl 112-119.

Hartmann F, Kampmann M, Frey N. Biochemical markers in the diagnosis of coronary artery disease. Eur Heart J. 1998 19: suppl 2-7.

Keiko N, Kenji N, Yutaka N, Wataru O, Michiro S, Kiyofumi O, Noriyuki M, Naoki T, Chiuchi I Serum levels of cardiac troponin I and other marker proteins in patients with chronic renal failure. Clin Exp Nephrol 2004 8: 43-47.

Martin GS, Becher BN, Sculman G. Cardiac Troponin Accurately predicts myocardial injury in renal failure. Nephrol Dial Transplant 1998 Jul; 13(7): 1709-12.

Martin GS, Becker BN, Schulman G. Cardiac troponin-I accurately predicts myocardial injury in renal failure. Nephrol Dial Transplant 1998 Jul; 13(7): 1709-12.

Mockel M, Schindler R, Knorr L. Prognostic value of cardiac troponin T and I elevations in renal disease patients without acute coronary syndromes: a 9-month outcome analysis. Nephrol Dial Transplant 1999 14: 1489-1495.

Peetz D, Schtt S, Sucke B, Faldum A, Wandel E, Hafner G, Lackner K. Prognostic value of troponin T, Troponin I, CK-MB mass in patients with chronic renal failure. Medizinische Klinik 2003 98: 188-92.

Stolar J, Gerges B, Shita A. The predictive value of cardiac troponin T measurements in subjects on regular haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 1999 14: 1961-1967.

Stubbs P. The cardiac troponins: uses in routine clinical practice. Experiences from GUSTO and other clinical trials. Eur Heart J. 1998 19: 59-63.

Address correspondence to:
Dr. Giovanni Trinchese
Via G. Velotti 10, 80030 Cimitile (NA)

Pervenuto il 17/03/2012

APPROCCI METODOLOGICI DI GOVERNANCE APPLICABILI ALLA PATOLOGIA CLINICA: IL BENCHMARK ED IL CONTROLLO DIREZIONALE. ANALISI DELLA SITUAZIONE ATTUALE E PROSPETTIVE FUTURE

GIUSEPPINA VIBERTI*, PAOLO MARTINETTO*, EMANUELE DAVIDE RUFFINO**, LOREDANA RORATO***,
ELISA CAMUSSO****, PAOLO GIRAUDO*****

* S.C.D.O. Patologia Clinica A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO).

** S.C. Gestione Economico Finanziaria e S.C. Controllo di Gestione, A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO).

*** S.C. Controllo di Gestione, A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO).

**** Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica- Università degli studi di Torino

***** Gruppo Innovo s.a.s, Torino

Abstract

The benchmarking is an indispensable tool of evaluation to compare the performances of the laboratories, but deep renovations are necessary to face the challenges of the future. In this work have been identified few intervention points: outputs reliability's and effectiveness', management accounting for process optimization, outcome's appropriateness and system's governance. For each one of this points have been detected some indicators through which compare the organizations, improve diagnostic processes and assess the obtained results. To evaluate the system's governance it is necessary to collect the data uniquely and compare them with a unique computer system by experienced staff. Currently the considered data are predominantly economic but this is not enough because the diagnostic activity needs to be integrated with the overall business activity using a multidisciplinary approach and must be contextualized in the assessment of the benefits in medium and long period for the population.

Introduzione

Con benchmark, o più spesso e coerentemente con la voce inglese "benchmarking", si intende un processo continuo di misurazione di prodotti, servizi e prassi aziendali mediante una metodologia basata sul confronto sistematico che permette alle aziende che lo applicano di compararsi con le migliori del settore e soprattutto di apprendere da queste per migliorare. In Sanità Pubblica il benchmark rappresenta la versione critica, come una fotografia istantanea, delle pratiche adottate, che consente di determinare quali siano quelle preferibili (Ruffino, 2011). Il confronto può essere non solo tra diverse unità operative, o dipartimenti, ma anche over time, ossia un monitoraggio nel corso del tempo in termini di output ed outcome, dei processi di produzione della medesima unità. Essendo la Sanità un settore in cui le regole che governano l'economia vanno ponderate rispetto ad altri principi di carattere non solo sanitario ma anche etico, il benchmarking va inserito all'interno di una rete progettuale ben più articolata (D.G.R. n. 19-6647, 2007).

Da sempre, ma a maggior ragione in un momento storico come quello che stiamo attraversando, la governance del sistema deve tener presente non solo la domanda di salute dei cittadini ma anche del-

le risorse al momento disponibili ed attuare quindi strategie mirate per impiegare tali risorse al fine di soddisfare nel miglior modo la richiesta (D.G.R. n. 1-415, 2010). Solo un controllo direzionale amministrato con competenza, dotato di metodi di valutazione basati su parametri validi e condivisi, non unicamente sanzionatorio, può garantire una gestione il più possibile razionale volta al raggiungimento degli obiettivi aziendali (Scheggi, 2006). All'interno della Patologia Clinica vi sono state negli ultimi decenni innumerevoli innovazioni che hanno modificato profondamente il tipo di attività degli specialisti del settore pertanto la figura professionale del patologo clinico ad oggi assume delle caratteristiche nuove che richiedono non soltanto una formazione di base ad impronta manageriale ma soprattutto un rinnovamento culturale volto ad assicurare, attraverso un costante confronto con gli altri ed una pianificazione strategica in staff, un miglioramento continuo. Il benchmarking, inteso appunto come confronto di processi, prodotti e servizi erogati dall'Azienda Sanitaria, è uno strumento potentissimo a disposizione delle direzioni aziendali per stimolare l'efficacia e l'efficienza dei propri processi. Un'analisi completa e critica da cui partire per costruire strategie di miglioramento attuabili richiede inoltre l'integrazione dei dati ri-

cavati dal benchmarking con il sistema di valutazione del personale ed il sistema incentivante; in questo modo si avrà una fotografia quanto più possibile realistica della situazione da cui partire per pianificare nuovi interventi (Presidenza del Consiglio dei Ministri, 2011).

Il lavoro che abbiamo svolto è consistito appunto in un'analisi dei dati disponibili nella nostra realtà Piemontese e nell'individuazione di alcuni possibili parametri da impiegare nella quantificazione delle variazioni di dati riguardanti outcome e output in termini di miglioramento.

Materiali e metodi

L'analisi si è articolata su tre differenti livelli: 1- Regionale (Piemonte), 2- Area Sovrazonale (Federazione 3 Torino Ovest), 3- Aziendale (A.O.U. San Luigi). La Federazione 3 Torino Ovest (FS3) comprende l'intera ASL TO3 di Collegno (che include 2 ospedali cardine – Rivoli e Pinerolo-, 1 ospedale di territorio – Susa- e 3 piccoli ospedali – Venaria, Avigliana e Giaveno- in fase di riconversione), due ospedali di riferimento (A.S.O. Ordine Mauriziano e A.O.U. San Luigi Gonzaga), le circoscrizioni 1,2,3 dell'ASL TO1 (che comprendono un ospedale cardine) (DGR n. 16-1829, 2011). In questo territorio sono presenti anche l'IRCCS (Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro a carattere Scientifico) di Candiolo ed il Centro Regionale Antidoping A. Bertinaria - Laboratorio regionale di tossicologia. L'attività di queste ultime due strutture non è stata considerata perché hanno una costituzione giuridica differente (uno privato convenzionato e l'altro è un Consorzio Regionale ad impronta parzialmente privata). La popolazione presente nella FS3 è di circa 930.000 abitanti corrispondenti al 20% della popolazione piemontese totale che è pari a circa 4.710.000 abitanti.

È stata analizzata la produzione Ambulatoriale e di Pronto Soccorso del Laboratorio Analisi dell'A.O.U. San Luigi di Orbassano e questa è stata confrontata con i risultati degli altri laboratori piemontesi sulla base dei dati regionali per gli anni 2010 e 2011 (in fase di elaborazione regionale e non ancora disponibili i dati del 2012).

Abbiamo suddiviso le prestazioni incluse nella branca 98, secondo il Tariffario Regionale in vigore, nelle seguenti classi: laboratorio, anatomia patologica, genetica, immunoematologia/trasfusionale, prelievi, visite TAO. Inoltre le prestazioni offerte dal laboratorio sono state stratificate in base alla tariffa, alle indicazioni regionali e all'esperienza degli operatori, in 3 livelli di complessità: alta, media e bassa. Per fare alcuni esempi l'emocromo che da tariffario regionale vale 4,90 euro viene considerato a bassa complessità, così come un esame di chimica clinica semplice, quale per es. la glicemia, che da tariffario vale 1,55 euro; un esame di autoimmunità, per es. anticorpi antinucleo, che

da tariffario vale 11,60 euro viene annoverato nelle prestazioni a media complessità, come anche il TSH (valore 13,70 euro); esami più specialistici quali la cromogranina A o l'omocisteina (da tariffario 30 euro) o l'identificazione del micobatterio tubercolare in biologia molecolare (valore 45 euro) fanno parte delle prestazioni ad alta complessità.

È stato poi calcolato il valore medio delle prestazioni erogate, valutato il consumo regionale di prestazioni anche in relazione al bacino di utenza dell'A.O.U. San Luigi e sono stati rapportati i dati di produttività del laboratorio analisi dell'A.O.U. San Luigi con la spesa per i reagenti, per i prodotti di consumo e per le risorse umane.

Non è stato possibile fare un confronto interaziendale per le prestazioni per gli "interni" (ricoveri ordinari e Day Hospital) in quanto i dati regionali non sono confrontabili tra loro, poiché ogni azienda li aggrega diversamente secondo un proprio criterio e nella maggior parte dei casi sono ricomprese nel singolo DRG; è stata quindi considerata solo l'attività del nostro laboratorio.

Per l'analisi è stato impiegato un software chiamato ABACO- modulo Benchmarking Attività PIA, attraverso cui, utilizzando un programma di Business Intelligence aggiornato trimestralmente con i dati regionali dei piani di attività, è possibile in modo semplice e rapido analizzare e confrontare tutta la produzione regionale di più anni in termini di SDO, attività ambulatoriale e di pronto soccorso.

Risultati

1) Analisi dei dati a livello Regionale

Per quanto riguarda la Regione Piemonte l'analisi degli esami compresi, secondo il tariffario regionale in vigore, nella Branca 98 è stata condotta sia in termini di volumi di produzione che di valori economici. Come è ben visibile nei due grafici sotto riportati (figura 1 e 2) il laboratorio occupa la gran parte delle prestazioni sia per quanto riguarda i volumi di produzione che per il valore economico (rispettivamente 91.64% e 89.3%). Le maggiori differenze si ritrovano nelle prestazioni della genetica e dell'anatomia patologica che a fronte di volumi di produzione bassi (0.1-0.3%) assorbono valori economici decisamente superiori rispetto alle altre (3.1% e 2.4%). Questo fenomeno è dovuto al fatto che le prestazioni specialistiche di queste branche sono numericamente esigue ma sono di complessità e specialità tale da avere un valore economico maggiore. Anche per il laboratorio TAO vale questa considerazione, infatti esso rappresenta una percentuale minima dei volumi di produzione (appena lo 0.4%) ma ha un valore economico di 1.6% del totale (perché richiede l'intervento di personale medico nella gestione del risultato dell'INR e nell'elaborazione dello schema posologico).

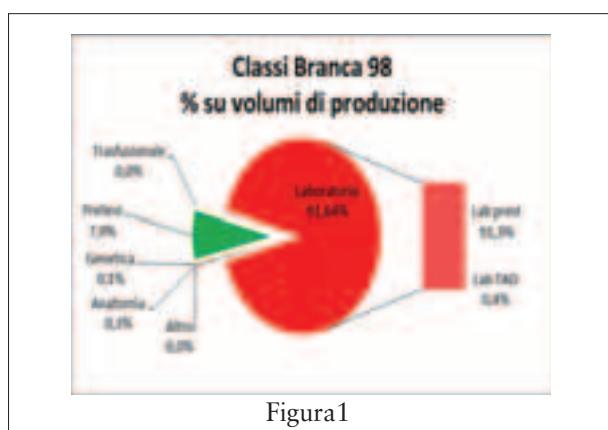


Figura 1: volumi di produzione branca 98

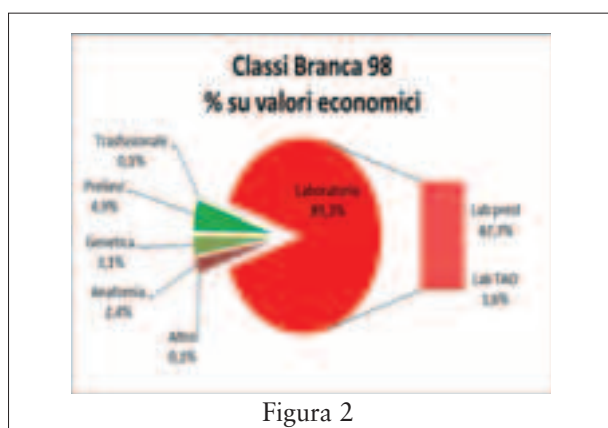


Figura 2: valore economico branca 98.

È stato poi confrontato il valore medio delle prestazioni suddividendole in base alla classe di complessità, nel 2011 rispetto al 2010 (figura 3). Dal 2010 al 2011 il costo medio di ciascuna prestazione è variato di 0.1 euro (da 4.6 a 4,7 euro/prestazione), e per quanto riguarda le prestazioni a bassa e media complessità non vi sono state grandi variazioni (rispettivamente 2.7 euro e 13.5/13.6 euro); la classe che ha sicuramente incrementato il suo valore è quella delle prestazioni ad alta complessità, che è passata da 90,9 nel 2010 a 96 euro/prestazione nel 2011.

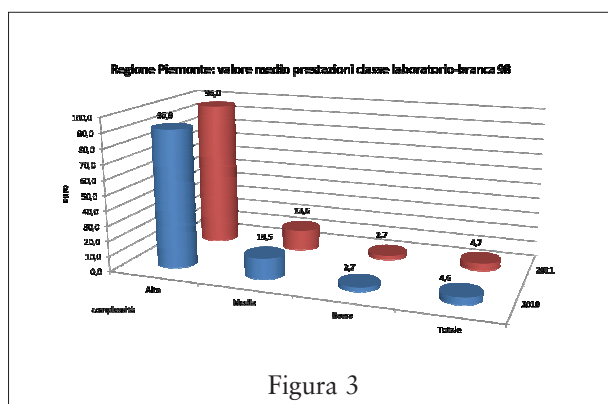


Figura 3: valore medio delle prestazioni stratificate per livello di complessità in Piemonte.

Il volume di attività (in termini di numero totale di prestazioni) è anch'esso aumentato del 2.16% (per dare un'idea dell'entità da 51.994.864 prestazioni totali nel 2010 si è passati a 53.121.093 nel 2011), ma mentre le prestazioni a bassa e media complessità sono aumentate dell'1.8 e del 3.6%, quelle ad elevata complessità sono cresciute del 19.5%. Va tuttavia tenuto presente che queste ultime sono quantitativamente esigue, rappresentando solo lo 0.29% del totale delle prestazioni di laboratorio (153.799 nel 2011).

Per completezza è stata considerata la percentuale di prestazioni consumata da ciascuna ASL nel biennio 2010-2011 (figura 4). Per quanto riguarda le ASL di Ivrea, Chieri, Vercelli, Biella, Novara, Omegna, Cuneo ed Asti i valori percentuali si sono mantenuti stabili nel biennio (dal 3 all'8% a seconda dell'ASL e del rispettivo bacino di utenza), così come quelli delle ASL di Collegno (13%) ed Ivrea (12%), l'ASL Torino 1 è passata dal 12 al 10% e quella di Torino 2 dal 9 al 13%. Questa variazione è dovuta alla chiusura/riqualificazione di alcuni presidi compresi nella ASL TO1, pertanto la popolazione, che non è variata demograficamente, ha semplicemente utilizzato le prestazioni offerte dalla TO2.

La percentuale di prestazioni per residenti fuori regione è rimasta molto contenuta (dal 2 al 3%).

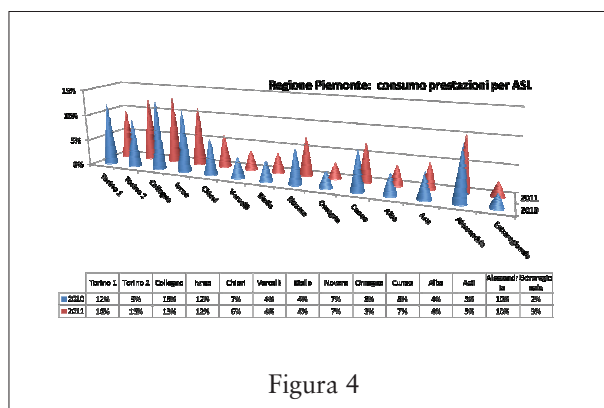


Figura 4: consumo di prestazioni per ASL in Piemonte, 2010-2011.

2) Analisi dei dati a livello Sovrazonale (Federazione Sanitaria 3- Torino Ovest).

Sono stati confrontati i valori di produzione dei differenti Ospedali/Presidi appartenenti alla FS3 nel 2010 e nel 2011 (figura 5).

Gli Ospedali di riferimento, San Luigi e Mauriziano, hanno mantenuto pressoché stabile la loro produzione, così come è avvenuto per l'Ospedale Martini. Le maggiori differenze si trovano nei valori di produzione degli ospedali di Venaria ed Avigliana, che hanno ridotto la loro produttività rispettivamente del 72.5 e dell'85,5%. Questo perché all'atto della costituzione del Piano Sanitario Regionale 2011-2015 (PSSR 2011-2015) gli ospedali di Avigliana e Venaria sono stati indirizzati ad una ri-

qualificazione/ridestinazione e pertanto il laboratorio è di fatto stato sostituito da un centro prelievi che fa capo al laboratorio di Rivoli. Ciò spiega il corrispettivo aumento della produzione principalmente degli ospedali di Rivoli e Pinerolo.

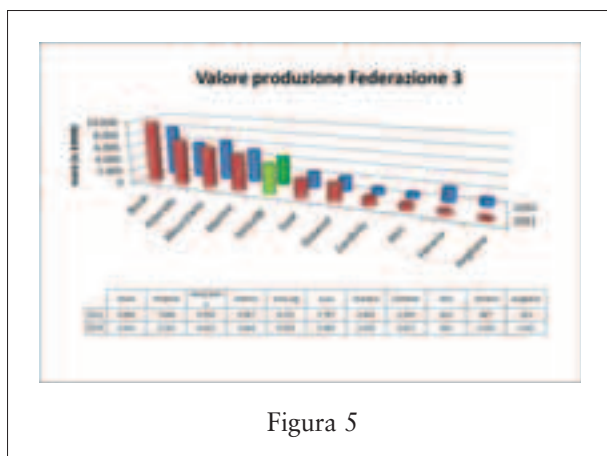


Figura 5

Figura 5: valore produzione FS3.

3) Analisi dei dati a livello Aziendale (A.O.U. Azienda Ospedaliera Universitaria San Luigi di Orbassano)

Dapprima è stato valutato il bacino di utenza che accede ai servizi offerti dal laboratorio del San Luigi. Essendo il nostro ospedale un'A.O.U., non possiede un territorio proprio di pertinenza, ma per ragioni principalmente geografiche (l'ospedale si trova in una cittadina dell'interland torinese) vi hanno accesso per il 70% pazienti residenti nell'ASL TO 3 di Collegno, per il 10 % pazienti dell'ASL TO 1, per il 5% pazienti dell'ASL TO 2, per un altro 5% pazienti dell'ASL di Chieri. L'accesso da parte di utenti delle altre ASL piemontesi è minimo (ASL di Ivrea 3%, ASL di Cuneo ed Asti 1%), così come l'accesso extraregionale (3%). Sotto questo aspetto i dati del 2010 non si discostano significativamente da quelli del 2011. L'accesso da parte di pazienti non residenti nelle ASL limitrofe si ha soprattutto per via della presenza all'interno del nostro Ospedale di Centri di Riferimento Regionali per patologie di importante rilevanza sociale quali la Sclerosi Multipla e le Microcitemie, ed anche per l'esperienza maturata negli anni da parte della Pneumologia nella diagnosi e cura della tubercolosi che hanno reso il San Luigi uno dei centri che maggiormente se ne occupa nella nostra regione. Questa affermazione è ulteriormente confortata dall'analisi del bacino di utenza alle prestazioni, stratificando queste ultime per livello di complessità (figura 6).

Come si può evincere dal grafico, alle prestazioni a bassa e media complessità hanno accesso per il 68-71% pazienti dell'ASL TO3, per il 15-16% pazienti di Torino e per 11-13% pazienti di altre ASL regionali. Cambia invece la distribuzione delle prestazioni ad alta complessità, che scendono al 65%

per i pazienti dell'ASL TO3 ed al 12% per i pazienti delle ASL di Torino, ma aumentano al 21% per le altre ASL regionali; l'accesso extra-regionale si mantiene stabile al 2-3% per tutti e tre i livelli di complessità.

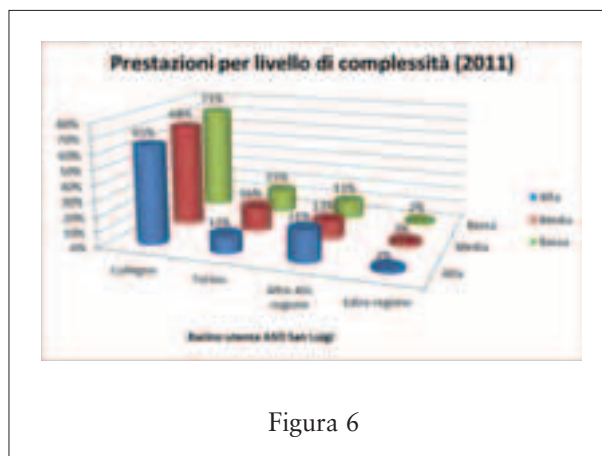


Figura 6

Figura 6: prestazioni stratificate per livello di complessità nel bacino d'utenza dell'A.O.U. San Luigi.

L'analisi è proseguita suddividendo la produzione del nostro laboratorio in base ai seguenti tipi di attività: 1) Pronto Soccorso (PS) seguito da ricovero, 2)PS non seguito da ricovero, 3)prestazioni a ricoverati e 4) ambulatoriali esterni; sono stati confrontati i dati del 2011 con quelli del 2010 sia in termini di numero di prestazioni erogate che in termini di valorizzazione.

Si rilevano, negli anni presi in esame, due tipi di andamento profondamente differenti, uno in crescita per quanto riguarda le prestazioni di pronto soccorso ed uno in diminuzione per quelle a ricoverati. Valutando i dati per singola attività le prestazioni per il PS seguito da ricovero sono cresciute in un anno del 6.2% ed il loro valore aumentato del 7.43%; analogamente le prestazioni per il PS non seguito da ricovero sono cresciute del 10.68% ed aumentata del 12.71% la loro valorizzazione. Il trend in crescita si è riscontrato, seppur molto più contenuto, anche per le prestazioni ad ambulatoriali esterni (+ 2.96% in termini di prestazioni, + 1.87% di valorizzazione). Differente andamento hanno avuto invece le prestazioni per i ricoverati, che si sono ridotte in un anno dell'8.42% ed in termini di valorizzazione diminuite dell'8.50%. Questo dato è stato sicuramente determinato dai provvedimenti messi in atto dal laboratorio analisi al fine di applicare correttamente l'appropriatezza prescrittiva (D.G.R. n. 21-9688, 2008); utilizzando il sistema informatico è stato possibile controllare e filtrare le richieste dei differenti reparti, eliminando così gli esami inappropriati. Per portare degli esempi pratici alcuni esami non vengono ripetuti se già eseguiti a distanza di breve periodo (con un cut off temporale per l'esecuzione determinato dalle indicazioni date delle LG) (Graziani MS, 2008), così come non vengono ripetute indagini su caratteristiche che

sono determinate geneticamente; non vengono eseguiti più esami diagnostici per una singola patologia quando le indichino la sufficienza della positività di uno solo di essi per confermare la diagnosi (Tozzoli R, 2002); alcuni esami ad elevata specializzazione, quali quelli allergologici specifici, vengono eseguiti solo quando richiesti dallo specialista in materia su apposita modulistica (come indicato dalle direttive regionali); sono impostati sulle strumentazioni programmi per eseguire esami reflex.

I dati di produttività del laboratorio sono stati quindi rapportati con la spesa per i reagenti, per i prodotti di consumo e per le risorse umane impiegate. Anche in questo caso dei provvedimenti gestionali mirati, quali per esempio l'ottimizzazione della distribuzione dei reattivi a bordo o l'esecuzione di determinate analisi in sedute analitiche programmate e con una numerosità campionaria maggiore, hanno reso possibile l'abbattimento dei costi per reagente/personale. Nel 2011 i costi per i consumi di materiale sono diminuiti del 4.6% e quelli del personale del 6.2%. Va precisato che la riduzione delle spese per il personale è dovuta principalmente alla politica imposta del Piano Sanitario Regionale che prevede il blocco di nuove assunzioni e pertanto il personale è stato profondamente riorganizzato nella sua attività senza sostituire quello uscente. Tutti questi provvedimenti hanno portato ad un risultato complessivo di riduzione del costo medio per singolo esame, che è passato dal 0.58 euro nel 2010 a 0.57 euro nel 2011 e soprattutto alla riduzione del rapporto costo per prestazione (ad interni)/DRG che è passato da 168 nel 2010 a 155,7 nel 2011.

Discussione

I dati fin qui presentati sono stati raccolti ed elaborati con lo scopo di ottenere una fotografia il più possibile reale della situazione produttiva dei laboratori Piemontesi e del nostro in particolare. Da un'analisi più approfondita è stato possibile focalizzare dei punti critici passibili d'intervento ed elaborare strategie attuabili nella pratica clinica al fine di migliorare il processo produttivo. Successivamente si sono ricercati degli indicatori in grado di "misurare" quanto questi interventi potrebbero incidere sul miglioramento dei processi (Majeed A, 2007). I punti d'intervento da noi individuati sono stati 1- l'affidabilità e l'efficacia dell'output, 2- l'analisi gestionale per l'ottimizzazione dei processi, 3- l'appropriatezza dell'outcome; 4- la governance di sistema.

1- Affidabilità ed efficacia dell'output: queste caratteristiche vengono messe in evidenza dall'analisi dei processi diagnostici, valutati singolarmente. È necessario puntualizzare che non vi è univocità nei processi diagnostici, siano essi prettamente laboratoristici o esclusivamente clinici o, come nella maggior parte dei casi, costituiti da entrambe le componenti. Pertanto risulta difficile porre a confronto un processo diagnosti-

co con quello che dovrebbe essere il riferimento condiviso da tutti per la diagnosi della patologia sospettata, perché appunto tale riferimento, in un'elevata percentuale di casi, non è stabilito. È tuttavia possibile confrontare fra loro le procedure operative impiegate da ciascun laboratorio per eseguire una determinata analisi all'interno di un processo diagnostico. Da tale confronto devono emergere le qualità ed i punti forza del processo, ma anche e soprattutto i punti di debolezza e le criticità, ove sia possibile intervenire. Un miglioramento nell'organizzazione del processo diagnostico stesso, deve essere però quantificato e pertanto sono stati proposti degli indicatori in grado di "percepire" la risposta di un sistema ad un fenomeno organizzativo (Arah, 2006).

Come rilevatore di produttività di un processo può essere utilizzato il rapporto tra gli input impiegati ed i benefici ottenuti. È molto difficile rapportare due entità così differenti, in primis perché la quantificazione dei benefici non può essere esclusivamente economica ed è comunque soggetta ad una valutazione personale del richiedente e poi perché il calcolo degli input impiegati è molto articolato. Nonostante la complessità di questo rapporto il processo diagnostico si snellirebbe notevolmente se al momento della pianificazione, e prima della richiesta di ciascun singolo esame, il clinico quantificasse, con i parametri a sua disposizione, il beneficio atteso dall'esito dell'analisi e rapportasse questo valore con gli input impiegati (banalmente con il costo dell'analisi). Portando il medesimo concetto a livello esclusivamente del laboratorio, come indice di produttività di un processo si potrebbe utilizzare il rapporto tra la quantità di reagenti impiegata per eseguire una determinata seduta analitica ed il numero di analisi in essa eseguite; oppure rapportare il personale impiegato (cioè il numero di persone e/o il tempo necessario per svolgere un determinato esame) con il valore economico dell'analisi (ed anche qui si potrebbe fare una lunga considerazione sul come viene determinato in questo momento il valore delle analisi da parte degli enti di competenza).

La coerenza dei risultati è un altro importante indicatore di un processo produttivo, di qualunque genere esso sia. Infatti il rapporto fra gli obiettivi assegnati in partenza e quelli ottenuti realmente al termine del periodo preso in esame sono un indice attendibile di quanto affidabile sia un processo. In sanità pubblica la determinazione dell'efficacia dell'output viene già misurata in termini di raggiungimento degli obiettivi aziendali assegnati a ciascun reparto/servizio. In laboratorio questo genere di valutazione può avvenire ponendo come obiettivo l'abbattimento di una determinata percentuale di richieste escludendo quelle che risultano inappropriate e quantificando dopo un determinato lasso di tempo quale sia stata la reale percentuale di richieste non evase.

Un ulteriore indicatore di affidabilità è il rispetto degli standard, siano essi economici, gestionali od organizzativi. Il problema principale nell'utilizzo di questo in-

dicatore è sicuramente il denominatore del rapporto, cioè quello a cui andrebbe raffrontato il parametro in esame. Si potrebbe infatti utilizzare come indice di efficacia la proporzione fra costi sostenuti e costi standard, ma questi ultimi sono spesso determinati da un tariffario regionale precostituito piuttosto che da quanto costi realmente la prestazione (calcolata come media ponderata dei costi complessivi per il singolo esame nei differenti laboratori). Pertanto il rapporto, se si utilizza come standard quello proposto dal tariffario in vigore, può risultare molto vantaggioso per alcuni esami (per cui il tariffario prevede un rimborso decisamente sopravvalutato rispetto al costo reale in termini di reattivi/tempo-lavoro) e decisamente svantaggioso per altri. Lo stesso tipo di ragionamento si può fare per il rapporto valore della prestazione/valore standard. Anche qui il denominatore impone grandi difficoltà, in quanto non vi è un valore standard per ciascuna prestazione, perché questa va contestualizzata all'interno dell'ambito in cui viene richiesta. Per fare un esempio pratico la determinazione della glicemia, che dal punto di vista puramente economico ha un costo irrisorio, assume un valore notevole quando la sua richiesta è appropriata nel contesto della diagnosi di diabete, piuttosto che nell'individuazione di uno stato ipoglicemico in un paziente in terapia insulinica. Per questo il valore standard della singola prestazione è molto influenzato dall'utilizzo stesso che si fa di essa. Altrettanto articolato è il rapporto tra il risultato clinico ottenuto ed il risultato clinico previsto. Anche qui è il denominatore il problema; al momento della richiesta del singolo esame il medico dovrebbe pensare a quale risultato clinico si aspetti dall'esito di tale analisi ma purtroppo spesso questo ragionamento viene meno (basti dire che secondo un recente studio è stato dimostrato che più del 10% degli esami richiesti, in ambito di ricovero, non viene nemmeno visionato da parte del richiedente) ed è dettato dalla "medicina difensiva".

L'analisi non può inoltre prescindere dall'individuazione del break even point (figura 7) che è un utilissimo strumento di valutazione della posizione all'interno dell'equilibrio economico determinato dalla propria produzione. Il break even point corrisponde al punto di pareggio, ossia a quel volume di produzione ottenuta in corrispondenza del quale i ricavi totali eguagliano i costi totali (intesi come somma dei costi fissi e dei costi variabili). In pratica indica a quale volume di attività la produzione diventa economicamente vantaggiosa. La formula matematica è:

$$[(\text{costi fissi} + (\text{costi variabili} \times \text{quantità prodotta})) / (\text{ricavi unitari} \times \text{quantità prodotta})]$$

Ma in sanità, e nel nostro caso in laboratorio, non è possibile applicare unicamente questo come mero criterio di selezione, cioè non si possono escludere dall'esecuzione quegli esami che per numerosità campionaria o per costo totale risultino svantaggiosi ma utili dal punto di vista clinico (ad esempio la meningococcemia virale è rara ma la sua diagnosi eseguita mediante la

PCR real time per test virologici su liquor è indispensabile). Vista la difficile situazione economica che il nostro paese sta attraversando, e considerando che le risorse sono limitate, si rende necessaria una valutazione globale che consideri la possibilità di convogliare l'esecuzione di determinati esami in una o poche sedi così da sgravare sedi periferiche dall'onere di eseguire esami economicamente non vantaggiosi, oltre che aumentare l'esperienza di pochi centri che si specializzino in quella direzione.

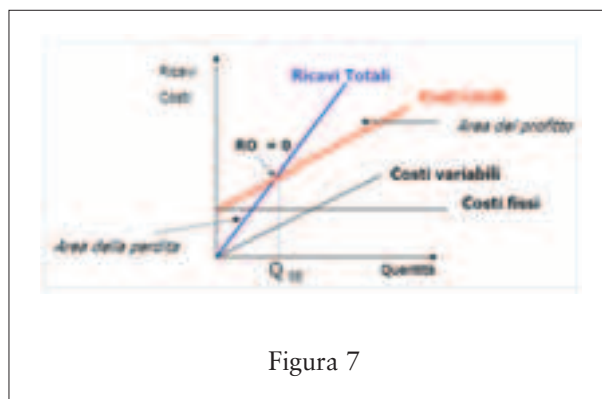


Figura 7

Figura 7: Break even point

2- Analisi gestionale per l'ottimizzazione dei processi. È fondamentale un'analisi gestionale che evidenzi possibili punti di miglioramento e/o perfezionamento, ma per fare ciò sono necessari non solo dei modelli organizzativi condivisi (e per questo ci vuole una predisposizione culturale al confronto ed alla collaborazione), ma anche dei criteri di valutazione stabiliti a priori in grado di verificare come i processi produttivi rispondano a parametri di razionalità. Vanno quindi analizzate quelle parti del processo che, se organizzate in modo differente, possono alleggerire l'intera procedura di lavorazione ed ottimizzare i tempi/risultati.

Nel nostro paese un pò in tutti i settori pubblici vi è la tendenza ad avere una burocrazia gravosa e a volte cavillosa che appesantisce enormemente la mole di lavoro. Per questo motivo un'analisi del carico burocratico, intesa come rapporto tra peso delle attività burocratiche e volume di attività svolte si rende indispensabile. In questo caso sul peso delle attività burocratiche si può intervenire alleggerendo e semplificando alcune procedure, servendosi del sistema informatico che consente di velocizzare, registrare e tracciare tutte le attività.

La riduzione dei tempi morti è sicuramente un ulteriore target su cui mirare un intervento migliorativo; il rapporto fra i tempi ottimali per l'esecuzione delle analisi e quelli reali deve tendere il più possibile ad 1. Quanto più il rapporto è inferiore ad 1, tanto maggiori saranno i tempi morti all'interno del laboratorio. La logistica assume un ruolo fondamentale nella progettazione dei nuovi laboratori; ed anche i vecchi laboratori necessitano di im-

portanti riorganizzazioni degli spazi ed introduzione di nuove tecnologie di automazione, al fine di azzerare i tempi morti (dovuti per esempio al trasporto dei campioni all'interno dei differenti settori del laboratorio). Il tempo "guadagnato" dall'ottimizzazione dei processi diviene una risorsa che può essere impiegata in altro modo o per il medesimo tipo di analisi, aumentando così la capacità produttiva, o destinata ad altra attività.

Altro punto su cui focalizzare l'attenzione è l'incidenza dei reagenti in rapporto alla produzione. I reagenti utilizzati sono molteplici ed hanno costi variabili fra pochi centesimi di euro a centinaia di euro per test; l'ottimizzazione del loro utilizzo consente di svolgere un pari volume di attività (inteso come erogazione di analisi) con un consumo minore dei reagenti. Le strategie attuabili sono molteplici e dipendono fondamentalmente dalle caratteristiche del reagente stesso (stabilità a bordo, metodo di conservazione, etc.) e dal tipo di analisi (eseguibile in regime di urgenza o di routine). Affinché la seduta analitica risulti valida ad ogni suo inizio deve essere processato un controllo di qualità interno; inoltre, per l'accreditamento, i laboratori sono tenuti ad avere un sistema di controllo della qualità esterno ed indipendente, che supporti la validità dei risultati forniti. Tutto questo comporta un utilizzo di reattivo che non viene rimborsato e che deve essere ammortizzato sull'esecuzione delle analisi cliniche. Strategie quali per esempio l'organizzazione di sedute analitiche numericamente più consistenti e l'esecuzione di determinati test su un unico strumento sono volte al miglior utilizzo delle risorse disponibili.

3- Appropriatezza dell'outcome. Non è sufficiente un'analisi dei costi, per quanto approfondita essa sia, per determinare se un laboratorio è efficace. È necessario considerare anche quanto la produzione di quel laboratorio sia davvero utile per i bisogni di salute della società. Quindi l'attenzione deve necessariamente spostarsi dall'efficienza all'efficacia, intesa come capacità di rispondere alle reali necessità del sistema (Scobie, 2006). Sono indispensabili degli indicatori che verifichino quanto l'outcome del laboratorio sia appropriato. Solo applicando in modo costante e parcellare l'appropriatezza prescrittiva è possibile ridurre quella parte di attività del laboratorio che non è utile perché non porta alcun beneficio alla società, ma pesa in modo importante sui costi complessivi; strategie quali l'individuazione e la non esecuzione di esami ripetuti (Miyakis, 2006), la cassazione di richieste inappropriate perché non supportate da un sospetto diagnostico che ne giustifichi l'esecuzione sono tutte volte al miglioramento di questo aspetto.

Per verificare quanto l'attività del laboratorio sia coerente con le aspettative del sistema ci viene in aiuto l'epidemiologia. I dati epidemiologici andrebbero sempre rapportati al numero di analisi

effettuate; ciò consente di valutare se l'esame (diagnostico per una specifica patologia) venga eseguito in quantità congrua al numero di malati (in base alla prevalenza/incidenza della malattia stessa) o se venga richiesto eccessivamente (non è corretto che un esame diagnostico per una patologia a bassa incidenza venga utilizzato come screening nella popolazione generale). È doverosa un'ulteriore distinzione tra le indagini diagnostiche (quindi quelle che sono necessarie al momento della diagnosi) e gli esami "di follow up", ossia quelli che servono per il monitoraggio dell'andamento della malattia o della risposta alla terapia. Questi ultimi andrebbero riservati esclusivamente ai pazienti con diagnosi accertata, mentre quelli diagnostici ai pazienti con sospetto clinico di malattia; ma dovrebbe comunque mantenersi costante la proporzione tra numero di esami richiesti e prevalenza/incidenza di malattia.

Il livello successivo nell'analisi dell'outcome è la verifica dell'output ottenuto inteso come rapporto fra benefici diretti ed indiretti per i cittadini e le risorse impiegate per ottenerli (Majeed et al, 2007). Mentre queste ultime sono quantificabili in termini economici (costo dell'esame, costo del personale, etc..) i benefici diretti (guarigione completa, remissione della sintomatologia acuta per le malattie croniche, etc) ma soprattutto quelli indiretti (ripresa dell'attività lavorativa, miglioramento della qualità della vita, etc) sono difficilmente stimabili ed è particolarmente complicata la loro misurazione in quanto non possono essere espressi esclusivamente in termini economici (per es. la qualità di vita del paziente è un valore di complessa valutazione). L'esecuzione di esami inappropriati non solo aumenta la quantità di risorse impiegate ma riduce i benefici. Infatti l'esecuzione di un esame non necessario e che risulti casualmente alterato innesca un meccanismo di approfondimento diagnostico, in assenza di manifestazioni cliniche, che viene portato avanti spesso inutilmente, con ricadute sociali importanti e comunque con un impatto sul PIL non trascurabile (D.G.R. n. 44-1615, 2011).

Un'ulteriore valutazione dell'outcome può essere eseguita rapportando le economie di scala con l'organizzazione armonica delle attività erogate anche in funzione delle caratteristiche dell'azienda sanitaria analizzata (case mix ed experience). Per economie di scala si intende, in gergo tecnico, la relazione esistente fra l'aumento della scala di produzione ed il costo medio unitario. L'aumento della scala di produzione è direttamente correlato alla dimensione dell'impianto, quindi vi è un rapporto inversamente proporzionale tra il costo medio dell'esame in oggetto e le dimensioni della linea analitica che lo esegue.

La tipologia di azienda sanitaria presa in considerazione influenza fortemente questo aspetto poiché

a seconda che essa sia A.S.L., A.S.O. o A.O.U. ha delle peculiarità proprie: le ASL devono tenere conto della realtà territoriale variegata, le ASO e le A.O.U. sono centri di riferimento, le A.O.U. hanno un importante ruolo nella didattica e nella ricerca e queste caratteristiche pesano non solo sulla mole di lavoro svolto ma anche sul livello di complessità di quest'ultimo.

4- Governance di sistema. La valutazione della Governance o verifica delle capacità di governo di una struttura, quale quella di un'azienda sanitaria, non può prescindere dal benchmarking. Quest'ultimo necessita, per rendere i dati confrontabili tra loro, di un unico sistema informatico in grado di raccogliere informazioni univoche per tutta la Regione. Inoltre deve essere disponibile un software di elaborazione adeguato: i risultati devono essere analizzati da personale esperto con le stesse modalità per le diverse aziende e per i differenti dati di produzione.

Al momento i dati che si possono analizzare sono principalmente quelli economici; è possibile porre in relazione i costi sostenuti dai laboratori di una determinata coorte con i ricavi attribuiti ai medesimi laboratori; a questo punto si può confrontare questo rapporto costo/ricavo con quello dei competitor (che spesso sono privati), e valutare la posizione economica rispetto a questi (Benchmarking del rapporto costi/ricavi).

Un altro modo di rilevare quanto il sistema sia governato è il calcolo dell'indice di tempo medio di adattamento alle nuove soluzioni: questo indice viene calcolato come rapporto fra il tempo impiegato dall'azienda sanitaria per l'introduzione di un nuovo processo con il tempo impiegato dai competitor. Una volta individuata una criticità, ed elaborata una strategia d'intervento per migliorare la situazione, il sistema necessita di un periodo per adattarsi alla nuova condizione così da raggiungere un nuovo equilibrio in condizioni verosimilmente migliori. Il tempo impiegato per questo processo deve essere congruo con l'entità delle modifiche apportate e rapportabile con le tempistiche dei competitor. Per fare un esempio pratico in laboratorio, quando viene introdotta una nuova metodica per la processazione di un determinato analita, è necessario un periodo di "adattamento fisiologico" per la formazione del personale, per l'integrazione dei sistemi informatici, etc... La quantità di tempo necessaria al sistema dipende sicuramente dall'entità delle modifiche apportate, ma è influenzata fortemente dal modello organizzativo sotteso ed dalla predisposizione del sistema stesso (per lo più del personale) al cambiamento.

Un utile indicatore della Governance di sistema è infine l'indice di ritardo nella diagnosi e nelle dimissioni. Quantificare il ritardo diagnostico è da sempre un problema aperto in sanità, in quanto, per la maggior parte delle diagnosi, non è determinata una tempisti-

ca entro cui sia necessario confermare il sospetto clinico. Tuttavia, grazie anche a studi di popolazione su ampia scala, per alcune patologie viene indicato un tempo medio tra l'insorgenza della malattia e la sua diagnosi; quando i tempi reali si allontanano marcatamente da questo riferimento si può parlare di ritardo. Diverso invece è per il ritardo della dimissione; questo a volte è direttamente dipendente dal ritardo diagnostico, ma può essere anche dovuto a problemi sociali/organizzativi. Spesso il paziente clinicamente dimissibile non può di fatto esserlo per via di fattori contingenti, quali per es. la necessità di un periodo di riabilitazione o l'impossibilità a rientrare al domicilio da solo, per cui i tempi di ricovero si dilatano; considerando i costi medi di degenza giornaliera nei differenti reparti questo fa lievitare enormemente la spesa. Il rapporto tra le giornate di ritardo della diagnosi/dimissione e le giornate di ritardo rilevate nelle coorte in studio da un'idea di quanto sia ben governato ed organizzato il sistema.

Conclusioni

Da tutte queste considerazioni si evince che l'attività di benchmarking è uno strumento indispensabile per valutare le performance di un laboratorio ma sono molti i punti su cui sono necessari profondi rinnovamenti.

Innanzitutto è indispensabile un dialogo all'interno dell'azienda e tra le aziende appartenenti allo stesso territorio con l'obiettivo di ricercare insieme possibili sinergie, di individuare le richieste inappropriate, di predisporre adeguati percorsi clinici condivisi con gli specialisti del settore e con gli esperti della gestione economica. La disponibilità "culturale" al confronto costruttivo è fondamentale; la gestione dei laboratori come singole unità operative che eseguono gli esami senza dialogare fra loro e senza rapportarsi con la realtà economica attuale non può portare ad alcun miglioramento. La diagnostica di laboratorio riveste un ruolo importante nel processo decisionale clinico e pertanto non può essere considerata "solo ed esclusivamente" dal punto di vista economico; per questo motivo i laboratoristi devono valorizzare la propria professionalità. Inoltre l'attività del laboratorio deve essere integrata con l'attività complessiva aziendale attraverso un approccio multidisciplinare in cui i vari specialisti portino come contributo la loro esperienza nella pratica clinica.

Altro aspetto fondamentale è che il numero assoluto di test eseguiti non deve essere l'unico criterio di confronto, tale dato deve essere contestualizzato all'interno delle tipologie di ospedale con il suo relativo bacino d'utenza e le caratteristiche di quel territorio, rapportato con l'esperienza degli operatori e con la presenza di elevata tecnologia e supportato dalle aree di ricerca e didattica qualora siano presenti (DGR 11-5524, 2013). Dalla valutazione di tutti questi parametri si potrà decidere co-

me distribuire alcuni esami specialistici tra le diverse strutture sullo stesso territorio: in pratica è fondamentale stabilire “chi”, “dove” e “come” eseguire determinati esami perché la ricaduta clinica di questi abbia maggior risultato (Legge Finanziaria 2007). Finché non sarà possibile confrontare i dati delle differenti aziende sanitarie (perché ciascuna utilizza una codifica differente per le proprie attività) sarà estremamente difficile trovare dei parametri con cui misurare quanto il sistema sia governato ed individuare invece i punti critici che sfuggono al controllo.

Bibliografia

Arah OA, Westert GP, Hurst J, et al. A conceptual framework for the OECD Health Care Quality Indicators Project. *Int J Qual Health Care* 2006, 18 (Suppl 1), 5-13.

D.G.R. n. 19-6647 del 03.08.2007. Riorganizzazione e razionalizzazione delle attività di laboratorio analisi. Prime indicazioni alle Aziende Sanitarie Regionali.

D.G.R. n. 21-9688 del 30.09.2008. Appropriately prescrittiva per le analisi di laboratorio. Regione Piemonte.

D.G.R. n. 1-415 del 2.08.2010. Approvazione dell'Accordo tra il Ministro della salute, il Ministro dell'economia e delle finanze e la Regione Piemonte per l'approvazione del Piano di rientro di riqualificazione e riorganizzazione e di individuazione degli interventi per il perseguimento dell'equilibrio economico ai sensi dell'articolo 1, comma 180, della legge 30 dicembre 2004, n. 311.

DGR n. 16-1829 del 07.04.2011. Attuazione Piano di rientro. Disposizioni alle Aziende Sanitarie Regionali in merito alla riorganizzazione della rete dei Laboratori Analisi, Anatomie patologiche e Servizi di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale (SIMT) e indirizzi su appropriatezza prescrittiva.

D.G.R. n. 44-1615 del 28.02.2011. Adozione dell'Addendum al Piano di rientro e al Programma attuativo, commi da 93 a 97, della legge 23 dicembre 2009 n. 191.

DGR 11-5524 del 14.03.2013. Riorganizzazione e razionalizzazione delle attività di Laboratorio di analisi. Ulteriori indicazioni alle Aziende Sanitarie Regionali.

Graziani M.S, Dolci A, Greco C, Luraschi P, Muratore M.T, Mussap M, Merlini G. per il Gruppo di Studio Proteine SIBioC. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi siero proteica. *Biochimica clinica* 2008, 32, 48-51.

Legge Finanziaria 2007 (art.1, comma 796, lettera O della legge 296/2006): Piano Regionale di riorganizzazione della rete delle strutture pubbliche di diagnostica di laboratorio Majeed A, Lester H, Bindman AB. Improving the quality of care with performance indicators. *BMJ* 2007, 335, 916-8.

Manuale operativo per il Controllo di Gestione. Analisi e Strumenti per l'Innovazione. Dipartimento della funzione pubblica per l'efficienza delle amministrazioni. Presidenza del Consiglio dei Ministri. Novembre 2001.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006 Feb; 4(2): 295-306.

Piano Socio Sanitario Regionale 2012 -2015. Regione Piemonte.

Scheggi M. Il Controllo Di Gestione nelle Aziende Sanitarie. Note a margine del dibattito in corso sul futuro possibile del SSN. *Health Management*, Istituto di Management Sanitario, Firenze, Settembre 2006.

Scobie S, Thomson R, McNeil JJ. Measurement of the safety and quality of health care. *Med J Aust* 2006, 184 (10 Suppl), 5, 13.

Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P, Bagnasco M, Camogliano L, Tampoia M. Linee Guida per l'impiego di test per autoanticorpi nucleo-citoplasmatici nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni sistemiche. Revisione 2002. Gruppo di Studio in Autoimmunologia della Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMEI).

Ruffino E.D., Capire la sanità. Logiche di funzionamento e approccio locale al mangment. Quaderno scientifico ARESS n. 1/2011. Ed. Politeia.

Address correspondence to:

Dr.ssa Giuseppina Viberti

Aou San Luigi Gonzaga - Regione Gonzole 10,
10043 Orbassano (TO)

Pervenuto il 18/03/2013

SEVERA EPATITE INDOTTA DAL PROPILTIOURACILE: UN CASO CLINICO

GIOVANNI TRINCHESE, FRANCESCO SCAFURO, LUIGI CALIENDO, LEONARDO ANTONIO NAPOLITANO*

* S.C. di Patologia clinica presidio ospedaliero "S.M. della Pietà" Nola (NA)

S.C. di Cardiologia Presidio ospedaliero "S.M. della Pietà" Nola (NA)

Abstract

A 39 year old woman was diagnosed as having Basedow disease. She received methimazole at first, which was discontinued to liver injury and piastrinopenia one year later, then propyl-thiouracil (PTU) was administered not showing clinical signs of adverse effects. Nine year later referred to our hospital with jaundice, fever, shock and her serum level of AST and ALT had increased. PTU therapy is stopped and consequently the levels of AST and ALT return to acceptable values. When we use PTU for patients with hyperthyroidism severe liver damage can be fatal, monthly ALT and AST monitoring may be cost-effective in reducing the severity of the liver side effect.

Introduzione

Il riscontro laboratoristico di una alterazione degli enzimi epatici in un paziente in apparenti buone condizioni di salute rappresenta un evento frequente e nello stesso tempo una sfida diagnostica. L'aumento sierico di ALT ed AST è un indice prognostico molto sensibile ed è direttamente proporzionale al danno epatocellulare. Il loro dosaggio è di uso routinario nella pratica clinica per valutare la funzionalità epatica, l'ipertransaminasemia è comunque solo un dato di laboratorio che però indirizza verso un danno epatico ed attiva un percorso decisionale finalizzato a stabilirne la vera causa.

È generalmente correlata a malattia da virus epatotropici, da CMV, da EBV, abuso alcolico. Esiste tuttavia una percentuale, anche se piccola, di ipertransaminasemia non associata a questi fattori eziologici. Il propiltiuracile (PTU) è un farmaco utilizzato nelle patologie ipertiroidee, ed annovera tra i possibili effetti collaterali rash cutanei, artralgia, febbre, piastrinopenia, un danno epatico che può spaziare dal temporaneo innalzamento asintomatico delle transaminasi ad una insufficienza epatica grave, talvolta ad andamento fulminante, che può condurre il paziente ad un esito fatale se non si interviene con un trapianto di fegato. A differenza degli altri effetti collaterali che si verificano nei primi cinque o sei mesi di terapia, questo evento inatteso può verificarsi in qualsiasi momento del trattamento (Ikuko et al, 2011).

Noi riportiamo il caso di una donna affetta da morbo di Basedow, trattata farmacologicamente con PTU, da oramai molti anni, in cui si è manifestata una severa forma di epatite accompagnata da una compromissione multi organo.

Presentazione del caso

Una donna di 50 anni in data 05/03/2013 viene ricoverata in stato di ipotensione, febbre, facies itterica

al pronto soccorso del P.O. di Nola. Dall'anamnesi familiare si apprende che nel 1999 le era stato diagnosticato un Basedow e trattata farmacologicamente in prima battuta con metimazolo. In seguito ad un quadro di ipertransaminasemia accompagnato da piastrinopenia, nel 2001 il metimazolo venne sostituito col PTU e da allora la paziente non aveva avuto alcun tipo di disturbo.

All'incirca una quindicina di giorni prima del ricovero la donna ha avuto un episodio febbrile con dolori addominali seguita da prurito generalizzato ma non continuo, lieve ed incostante confusione mentale e difficoltà nella formulazione delle parole, tremori ed agitazione transitoria; ma non aveva dato peso a tali sintomi clinici.

Nessuna storia di alcolismo, uso di droghe, trasfusioni di sangue o precedenti malattie epatiche.

I primi risultati dei test di laboratorio mettono alla luce un possibile danno epatico: AST 525 U/L (Val. di Riferimento < 38), ALT 309 U/L (Val. di Riferimento < 33), LDH 1633 U/L (Val. di Riferimento 240-280), BIL. T 3.28 mg/dl (Val. di Riferimento < 1,10), BIL. D. 1.91 mg (Val. di Riferimento < 0,30), PT% 34, INR 2.07; PTT sec. 38, PTT ratio 1.4, D-DIMERO 16748 ng/ml, Glicemia 26 mg/dl.

L'emocromo presenta una lieve leucocitosi con piastrinopenia moderata.

Gli altri esami fatti in urgenza sono normali. Viene fatta anche una TAC del torace (dati non mostrati) in cui si apprezzano piccole bolle aeree da enfisema sottocutaneo a sede apicale anteriore destra ed altre bolle aeree mediastiniche retrosternali con parenchima ad aspetto disomogeneamente addensato specie alle basi. Presenza di un versamento liquido a sede periepatica e perisplenica con fegato disomogeneo. La situazione peggiora nel giro di poche ore. Al successivo controllo, fatto cinque ore dopo, il valore di

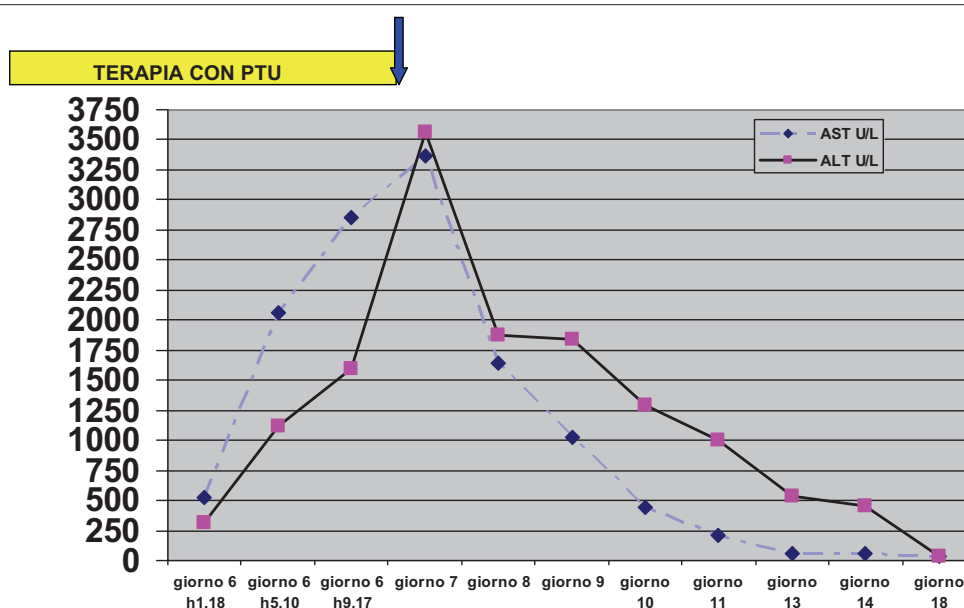


FIG. 1. ANDAMENTO SIERICO DI AST E ALT

Figura 1

AST è 2059 U/L, di ALT è 1113 U/L.

Viene trasferita in reparto dove la situazione epatica continua a peggiorare, come si evince dai valori delle AST che giungono a 2858 U/L, e delle ALT che giungono a 1593 U/L.

In reparto vengono effettuate altre indagini laboratoristiche per la ricerca di una possibile causa virale ed autoimmune. Lo studio virale ha mostrato reazione negativa per l'Epatite A, l'Epatite B, l'Epatite C, CMV negativo, VCA IgM negativo, VCA IgG negativo, EBNA positivo. La ricerca di autoanticorpi evidenzia che gli ANA sono positivi 1:100 con pattern granulare. ENA negativi, ASMA negativi, LKM negativi, ANCA negativi. Il TSH 0.01 uUI/ml, FT3 2.98 pg/ml, FT4 1.00 ng/ml, Tireoglobulina 627 ng/ml, Antitireoglobulina 632 UI/ml, ABTPO 571 UI/ml.

Dal giorno 7/03/ le viene sospeso il PTU ed inizia anche la terapia cortisonica, dal giorno 8 i livelli delle transaminasi e degli altri indici epatici iniziano a scendere gradualmente fino al giorno della dimissione avvenuta in data 19/03/2013 (Fig. 1.)

Discussione

Il propiltiuracile (PTU) inibisce l'enzima tireoperossidasi, che agisce normalmente nella sintesi dell'ormone tiroideo ossidando l'anione ioduro a iodio facilitando l'incorporazione dello iodio nei residui tirosilici delle tireoglobuline e a livello periferico inibisce l'enzima 5-deiodinasi che converte il T4 nella forma attiva T3 (Saber et al, 1975). L'insorgenza di effetti collaterali è bassa: si possono avere orticaria, nausea, febbre, vasculiti cutanee, polmoniti interstiziali (Aloush et al, 2006; Tetikkurt et al, 2012; Ohwada et al, 2003) L'epatotossicità è un effetto col-

laterale raro ma che può determinare una improvvisa insufficienza epatica talvolta ad andamento fulminante con conseguente morte (Ichiki et al, 1998). Tale effetto può verificarsi in qualsiasi momento in corso del trattamento (Memi et al, 2012; Bahn et al, 2009).

La relazione di causalità tra farmaco e danno epatico (Hanson JS, 1984) si basa su:

- 1) Evidenze cliniche ed alterazioni dei test di funzionalità epatica.
- 2) Segni e sintomi collegati all'utilizzo del farmaco
- 3) Nessuna evidenza sierologica con concomitante infezione virale di tipo A; B; C; CMV; EBV.
- 4) Assenze di altre cause come sepsi, intossicazione alcolica deficit di alfa1 antitripsina, Emocromatosi, patologie autoimmuni.
- 5) Sicurezza che nessun farmaco epatotossico è stato utilizzato.

Nel caso clinico da noi riportato vi sono queste relazioni di causalità. Negative sono risultate le indagini sierologiche per la ricerca dei markers virali per una epatite di tipo A; B; C; per CMV; o per EBV. La ricerca negativa di autoanticorpi ASMA, LKM, ANCA, ENA esclude una possibile epatopatia di origine autoimmune, tantomeno sono presenti gli altri fattori che potrebbero generare l'insorgenza di una epatopatia acuta. Di contro la donna riferisce di un malessere generale che l'assunzione del PTU le provocava da un pò di tempo.

Le analisi di laboratorio mostrano un rapido danno citolitico a carico del fegato come si evince dal rapido incremento dei livelli di AST e ALT che dal momento del ricovero in PS nel giro di sole otto ore sono aumentate di oltre 1000 volte rispetto ai valori di riferimento, per poi decrescere nei giorni successivi

al blocco dell'assunzione del farmaco e un danno colestatico con aumento della bilirubina totale e diretta (Tab.1.) e della fosfatasi alcalina, con decremento del PT. Queste alterazioni laboratoristiche sono compatibili con un danno epatico indotto da un farmaco (Moseley, 1996). Il blocco dell'assunzione del PTU da luogo ad una continua normalizzazione degli enzimi epatici che nel giro di quindici giorni rientrano nei parametri di normalità (Fig. 1).

Anche la TAC del torace (dati non mostrati) fatta il 18 Marzo evidenzia un netto miglioramento, rispetto alla precedente, con regolare opacizzazione del tronco della polmonare e dei suoi rami principali senza evidenza di difetti di opacizzazione endovascolari di tipo centrale e periferiche e non sono visibili aree di alterata densitometria parenchimale.

La donna viene dimessa in data 19 Marzo con i valori di funzionalità epatica nella normalità. Ritorna in ospedale per un controllo di laboratorio il giorno 27 marzo quando non ha ancora ripreso ad assumere il PTU ed i dati di laboratorio mostrano solo un lieve rialzo delle ALT con una logica impennata degli ormoni tiroidei.

L'oscillazione degli indici della funzionalità epatica nei soggetti ipertiroidici è una possibile conseguenza conosciuta da molto tempo ed è osservata nel 15-70% dei casi (Gurlek et al, 1997); Anche nei pazienti trattati con PTU vi possono essere elevazioni asintomatiche di ALT nel 14-28% dei pazienti trattati nei primi sei mesi di terapia che si risolvono senza alcun intervento medico (Liaw et al, 1993).

PTU induce un'acuta epatite nello 0.1-1.2% dei pazienti trattati (Huang et al, 1994) in cui è necessario intervenire medicalmente (Kim et al, 2001) con una mortalità associata a tale trattamento del 25% (Williams et al, 1997).

Il primo caso di epatite indotta da PTU è stata descritta nel 1947 (Livingston et al, 1947). Sei anni dopo è stato riportato il primo caso di epatite fulminante attribuito al PTU (Einsen, 1953).

Il danno epatico si pensa che si instauri per un meccanismo non dose dipendente ma sia indotto da una reazione idiosincrasica attivata dalla molecola. (Lee, 1995).

L'epatotossicità indotta dal PTU è rara ma può essere potenzialmente letale. Questo caso clinico rinforza il potenziale ruolo del PTU nell'indurre una epatite acuta e dal momento che il manifestarsi della tossicità epatica non è sempre un evento rapido, il monitoraggio laboratoristico delle ALT e delle ALP, visto il buon rapporto costo beneficio, è utile effettuarlo regolarmente per controllare e monitorare la possibile evoluzione di un transitorio e non dannoso aumento delle transaminasi verso una epatite acuta grave indotta dall'utilizzo farmacologico del PTU.

Bibliografia

Aloush V, Litinsky I, Caspi D, Elkayam O. Propylthiouracil-induced autoimmune syndromes: two distinct clinical presentations with different course and management. *Semin Arthritis Rheum* Aug 2006. 36 (1): 4-9.

Bahn RS, Burch HS, Cooper DS, Garber JR, Greenlee CM, Klein IL, Laurberg P, McDougall IR, Rivkees SA, Ross D, Sosa JA. The Role of Propylthiouracil in the Management of Graves' Disease in Adults: report of a meeting jointly sponsored by the American Thyroid Association and the Food and Drug Administration. *Thyroid* 2009, 19 (7): 673-4.

Gurlek A, Cobankara V, Bayraktar M. Liver tests in hyperthyroidism: effect of antithyroid therapy. *J Clin Gastroenterol* 1997, 24: 180-183.

Hanson JS. Propylthiouracil and hepatitis. Two cases and review of the literature. *Arch Intern Med* 1984, 11: 272-6.

Huang MJ, LI KL, WEI JS, Wu SS, Fan KD, Liaw YF. Sequential liver and bone biochemical changes in hyperthyroidism: prospective controlled follow-up study. *Am J Gastroenterol* 1994, 1071-1076.

Ichiki Y, Akahoshi M, Yamashita N, Morita C, Maruyama T, Horiuchi T, Hayashida K, Ishibashi H, Niho Y. Propylthiouracil-induced severe hepatitis: a case report and review of the literature. *J Gastroenterol* Oct 1998, 33 (5): 747-50.

Livingston HJ, Livingston SF. Agranulocytosis and hepatocellular jaundice: toxic reaction following propylthiouracil therapy. *The Journal of American*

Giorno 6

	h 01.18	h 05.14	giorno 8	giorno10	giorno 12	giorno14	Giorno18
Bil. Tot. mg/dl	3.28	3.76	3.82	3.43	2.40	2.22	1.80
Bil. Dir. mg/dl	1.91	3.08	2.79	2.84	1.90	1.73	0.94

Tab. 1. Andamento sierico della Bil. Tot./Dir.

Tab 1

- Medical Association 1947; 135. (7): 422-425.
- Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine* 1995; 333 (17): 1118-1127.
- Liaw YF, Huang MJ, Fan KD, Li KL, Wu SS, Chen TJ. Hepatic injury during propylthiouracil therapy in patients with hyperthyroidism: a cohort study. *Annals of Internal Medicine* 1993; 118 (6): 424-428.
- Kim HJ, Kim BH, Han YS, Yang I, Kim KJ, Dong SH, Kim HJ, Chang JW, Lee JI, Chang R. The incidence and clinical characteristics of symptomatic propylthiouracil-induced hepatic injury in patients with hyperthyroidism: a single-center retrospective study. *Am J Gastroenterol* 2001, 96 (1): 165-9.
- Memi E, Karras S, Tzotzas S, Krassas GE. Propylthiouracil hepatitis: report of a case and extensive review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012, 25 (3-4): 331-43.
- Moseley RH. Evaluation of abnormal liver function tests. *Med Clin North Am* 1996, (80) 887-904.
- Ohwada R, Kato K, Ohmori K, Isozaki O, Hotta M, Ono M, Takano K. A man with interstitial pneumonia due to propylthiouracil. *Intern Med* oct 2003, 42 (10): 1026-30.
- Saberi M, Sterling FH, Utiger RD. Reduction in extrathroidal triiodothyronine production by propylthiouracil in man. *J.Clin Invest* 1975, 55(2): 218-23.
- Tetikurt C, Yuruyen M, Tetikurt S, Bayar N, Ozdemir I. Propylthiouracil-induced lupus-like or vasculitis syndrome. *Multidiscip Respir Med* 2012, 7 (1): 14.
- Williams KV, Nayaks S, Becker D, Reyes J, Burmeister LA. Fifty years of experience with propyl thiouracil associated hepatotoxicity: what have we learned? *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(6) 1727-1733.

Address correspondence to:

Dr. Giovanni Trinchese

Via G. Velotti 10, 80030 Cimitile (NA)

Pervenuto il 09/04/2013

CHLAMYDIAL EYE INFECTIONS: FREQUENCY AND PATHOGENESIS IN PATIENTS ATTENDING AN EYE HOSPITAL

*FRANCO GIARDINI, *FABIO LEONE, *GIUSEPPE GRANDI, FEDERICA MACHETTA, FEDERICO M. GRIGNOLO

*Department of Clinical Physiopathology, Turin University, Italy.
Ophthalmology Section. Ophthalmic Clinic: Director - Prof. Federico M. Grignolo.
Department of Ophthalmic Hospital, Turin, Italy.

Abstract

Purpose. *Our aim was to evaluate the frequency of Chlamydia trachomatis infection in a population clinically diagnosed with conjunctivitis or keratoconjunctivitis and to determine the presence of predisposing factors.*

Methods. *We examined 756 patients using direct immunofluorescence to identify Chlamydia trachomatis. Patient registration included information on sex, age, date of symptoms and signs of infection onset, frequency of swimming-pool attendance, contact lenses use, presence of known concomitant genital infections.*

Results. *159 of the 756 patients were positive: 52 males and 107 females. The highest percentage of positive cases was found in the 16-20 female age group while the lowest was observed in the 61-75 male age group. A statistically significant difference in Chlamydia trachomatis positivity was found comparing the 16-25 and 61-75 age groups. Regular swimming pool attendance and the continuous use of contact lenses proved to be risk factors but without statistical significance. The percentage of positive cases was higher in acute than in chronic pathology.*

Conclusion. *Sexually active youth show a higher possibility of contracting conjunctivitis than older cohorts. However, eye infection by Chlamydia trachomatis is not only associated with age or sexual activity but probably also with unrecognized contagious factors.*

Chlamydial eye infections: frequency and pathogenesis in patients attending an eye hospital

Introduction.

Eye infection by Chlamydia trachomatis is one of the most frequent affections detected in clinical practice and is considered an enormous public health problem in both developing and industrialized countries (Ronnerstam et al, 1985). Neonatal and adult inclusion conjunctivitis and trachoma are the most popular forms of Chlamydia trachomatis infection (Dawson et al, 1981). At present trachoma is still the world's leading infectious cause of blindness and the leading cause of ocular morbidity. Trachoma, therefore, remains the leading cause of preventable blindness in the world today (John et al, 2001). Chlamydia trachomatis accounts for 30-40% of all non-gonococcal urethritides and for 20-50% of all cervicitis so adult inclusion conjunctivitis seems to suggest a hand-to-eye or genital-to-eye transmission. More rarely, indirect transmission by the use of under-chlorinated swimming-pool water

or contact lenses (Mannis, 1988) may occur. Transmission of ocular Chlamydia trachomatis infection within households is typically very efficient (Blake et al, 2009). Chlamydia trachomatis is one of the major causes of sexually transmitted infections (Peipert, 2003): the sexually-transmitted disease is caused by serotypes D to K, all of them leading to urethritis and cervicitis. It occurs more frequently in sexually-active young adults aged 15 to 30 (Ronnerstam et al, 1985; Mannis, 1988; Schachter, 1978).

Materials and Methods.

756 patients attending the Clinical Pathology Outpatients' at the Turin Eye Hospital with a diagnosis of conjunctivitis or keratoconjunctivitis and a request to test for Chlamydia trachomatis were examined. Of the 756 patients examined for Chlamydia trachomatis, 479 (63.3%) were female and 277 (36.7%) were male; a specimen from each eye was obtained from all of the patients so that altogether 1,512 specimens were obtained. A personal registration card including personal

data, symptom duration, frequency of swimming-pool attendance and contact lenses use, presence of known concomitant genital infections was prepared for each patient.

Identification of Chlamydia trachomatis was made by direct immunofluorescence using specific anti-Chlamydia monoclonal antibodies. Both members of staff examined each slide at a 400x magnification. Slides showing at least three intra- or extracellular elementary bodies were considered as positive.

Eye swabs for detection of pathogenic bacteria were obtained from each patient. Swabs were seeded both onto a chocolate agar medium and onto a chocolate agar medium containing poliViteX and bacitracin: the former was incubated at 37°C for 48 hours, the latter was incubated at 37°C for 48 hours in a humid carbon dioxide-enriched atmosphere to detect Haemophilus species.

The aim of this work was to evaluate:

- frequency of eye disease due to Chlamydia trachomatis;

- characteristics of frequency according to sex, age and symptom duration;

- the identification of a number of presumed risk factors, i.e. continuous use of contact lenses, regular attendance of swimming-pool, presence of known concomitant genital infections;

- the definition of the clinical cases of suspected conjunctivitis due to Chlamydia trachomatis which were later found to be bacterial conjunctivitis cases or bacteria-associated Chlamydia trachomatis conjunctivitis cases on bacteriological examination.

Results.

159 (21.03%) of the 756 cases examined for eye Chlamydia trachomatis tested positive, 52 (18.8%) being males and 107 (22.3%) females.

Patients were first divided into 18 five year age groups (0-90 years) and subsequently into broader age groups (16-75 years) as shown in Table 1 and 2, respectively.

Table 1. Patients divided by age, sex and relative frequency of positive cases.

Table 1. Patients divided by age, sex and relative frequency of positive cases.

AGE	TOTAL			POSITIVES			FREQUENCY %		
	Male	Female	Tot.	Male	Female	Tot.	Male	Female	Tot.
0 – 5	1	0	1	1	0	1	100	0	100
6 – 10	1	3	4	1	2	3	100	67	75
11 – 15	8	9	17	0	4	4	0	44	23.5
16 – 20	20	21	41	6	9	15	30	42.8	36.6
21 – 25	43	74	117	10	18	28	23.2	24.3	23.9
26 – 30	34	71	105	4	14	18	11.7	19.7	17.1
31 – 35	28	57	85	6	11	17	21.4	19.3	20
36 – 40	35	51	86	9	12	21	25.7	23.5	21
41 – 45	16	38	54	4	7	11	25	18.4	21.5
46 – 50	18	40	58	4	8	12	22.2	20	20.7
51 – 55	11	32	43	1	6	7	9	18.7	16.3
56 – 60	19	25	44	3	5	8	15.8	20	18.2
61 – 65	12	23	35	0	3	3	0	13	8.6
66 – 70	21	18	39	2	4	6	9	22.2	15.4
71 – 75	7	10	17	0	3	3	0	30	17.6
76 – 80	1	6	7	1	1	2	100	16	28.5
81 – 85	1	1	2	0	0	0	0	0	0
86 – 90	1	0	1	0	0	0	0	0	0

Table 2. Patients divided into broader age groups and relative frequency of positive cases.

AGE	TOTAL	POSITIVES	FREQUENCY %		
			<i>Tot.</i>	<i>Male</i>	<i>Female</i>
16 – 30	263	61	25.8	21.6	28.9
31 – 45	225	48	21.7	24	20.4
46 – 60	145	27	18.4	16.6	19.6
61 – 75	91	11	12.8	5	19.6

Table 3. Frequency of infection related to the duration of symptoms.

PERIOD	no. of PATIENTS	no. of POSITIVES	% of POSITIVES
<i>Days</i>	50	12	24
<i>Months</i>	347	80	23
<i>Years</i>	359	67	18.7

Table 4. Frequency of infection related to presumed risk factors.

RISK FACTOR	no. of PATIENTS	no. of POSITIVES	% of POSITIVES
<i>swimming pool</i>	47	12	25.5
<i>contact lenses</i>	123	31	25.6
<i>genital infection</i>	46	10	21.7
<i>swimming pool + contact lenses</i>	23	2	8.7
<i>swimming pool + genital infections</i>	10	2	20
<i>contact lenses + genital infections</i>	34	8	23.5
<i>genital infections + contact lenses + swimming pool</i>	8	1	12.5

Chi square analysis revealed a statistically significant difference between the two age groups “16-25 years” and “61-75 years” ($p<0.05$) in the total population, between the two age groups “31-45 years” and “61-75 years” ($p<0.05$) and between the two age groups “16-35 years” and

“61-75 years” ($p<0.01$) in the male population. Symptom duration in relation to frequency of infection is shown in Table 3, while the frequency of infection related to individual or associated presumed risk factors is shown in Table 4.

Lastly, Table 5 shows the result of eye swabs tests compared to Chlamydia trachomatis identification and a possible association between Chlamydia trachomatis infection and some bacterial infections was evaluated.

Discussion.

Direct immunofluorescence is considered to be one of the most sensitive detection methods for Chlamydia trachomatis by some Authors (Adenis et al, 1993; Carta et al, 1994) which is why it was chosen in this project. The 3 elementary body cut-off qualification was used to define a specimen as positive, not only because both of the two expert members of staff examined each specimen but also because paucibacillary flora is often responsible for evident symptoms in the field of ophthalmology (Krech et al, 1985).

The frequency of chlamydial eye infection in the overall population (21.03%) is consistent with the data published by Reccia (Reccia et al, 1994), 28.9%, and Rapoza (Rapoza et al, 1990), 19%, who used direct immunofluorescence too, and with those published by Talley (Talley et al, 1992), 13%, who used genic amplification as well as with those published by Adenis (Adenis et al, 1993), 19.2%, who used both direct immunofluorescence and the immunoenzymatic method, and Potts (Potts et al, 1986), 11%. Other Authors (Ronnerstam et al, 1985; Potts et al, 1986; Harding et al, 1987; Olafsen et al, 1986; Darougar et al, 1987; Wishart et al, 1984) generally found lower percentages of positive cases using the classic culture technique in their work.

More female than male patients were present in the general population, and the frequency of positive cases was slightly higher in females than in males.

The two age groups "16-25 years" and "61-75 years" in the total population showed that the frequency of infection decreased gradually with increasing age, as reported in the literature (Ronnerstam et al, 1985; Harding et al, 1987). Frequency of infection peaked in the 16-30 year age

group; in this age group, the highest percentage of positive cases (36.6%) was observed at ages 16-20 years, with a higher prevalence of infection among females (42.8%) than males (30%). Ronnerstam (Ronnerstam et al, 1985) and Harding (Harding et al, 1987) reported similar data which could be due to the fact that girls start their sexual activity at an earlier age compared to boys.

The decreasing frequency of infection with increasing age appeared more marked in males than in females, who showed a rather high frequency of infection at all ages. This could be partially due both to a higher chance of genital self-infection in women than in men and to other routes of contagion which could occur much more frequently in females than in males. As regards symptom lenght reported by the patients, it is interesting to observe that only 6% complained of an acute ocular pathology although the percentage of positive cases among them was 24%, which is higher than shown by the patients who complained of sub-acute or chronic disorders. This finding draws attention to the fact that clinicians consider Chlamydia trachomatis as a typical chronic infection so they do not search for its presence during earlier phases of infection maybe because there are still no valid diagnostic criteria.

Clinicians appeared to select the population according to presumed risk factors as almost two-thirds of the total population suffered from one or more of these factors. Regular attendance of swimming-pool and the continuous use of contact lenses seem to be the most influential factors determining susceptibility to contract chlamydial conjunctivitis, as it is known (Witcher, 1994; Oehme et al, 1991; Salopek-Rabatic, 2001). On the contrary, concomitant genital infections did not seem to be an important risk factor even if our knowledge of these infections is based exclusively on the anamnesis so patients could either withhold information about themselves or be unaware of asymptomatic infections. That's why we believe that all conjunctival smears for diagnosis of chlamydial infection should be completed by a search for the

Table 5. Results of eye swab tests associated to Chlamydia trachomatis search.

TOTAL OF POSITIVES	
82 (10.8 %)	
Positives in association with Chlamydia trachomatis 9 (1.2 %)	Positives unassociated with Chlamydia trachomatis 73 (9.6 %)
NEGATIVES	
674 (89.2 %)	

microorganism at the genital level or, better still, in urine using gene amplification technology.

About 10% of suspected chlamydial conjunctivitis were found to be bacterial or mixed infections: this gives an idea of how difficult it is to make a clinical diagnosis so it appears paramount to confirm it by the bacteriological examination, especially because these two pathologies are treated with different therapies.

In conclusion, we found that sexually active youth show a higher possibility of contracting conjunctivitis due to *Chlamydia trachomatis* than older members of the population, especially if they are regular swimming-pool goers or contact lens users. Furthermore, our work also provides evidence that ocular *Chlamydia trachomatis* pathology is not only chronic or genital infection, - age - and sex-associated pathology: it is most likely associated with unrecognized contagious factors, too. Other studies (Novak et al, 1995) have shown that microorganism can survive in the environment. Lastly, this study demonstrates the difficulty of making a clinical diagnosis and, as a result, the need for cooperation between clinicians and microbiologists.

References.

Adenis JP, Saint-Blancat P, Ranger S, et al. Place des conjonctivites à *Chlamydia trachomatis* chez l'adulte. Etude des techniques de diagnostic. *J Fr Ophthalmol.* 1993, 16(3), 178-183.

Blake IM, Burton MJ, Bailey RL, et al. Estimating Household and Community transmission of Ocular *Chlamydia trachomatis*. *PLOS Negl Trop Dis.* 2009, 3(3), e 401.

Carta F, Zanetti S, Pinna A, et al. The treatment and follow up of adult chlamydial ophthalmia. *Br J Ophthalmol.* 1994, 78(3), 206-208.

Darougar S, Woodland RM, Walpita P. Value and cost effectiveness of double culture tests for diagnosis of ocular viral and chlamydial infections. *Br J Ophthalmol.* 1987, 71, 673-675.

Dawson CR, Jones BR, Tarizzo ML. Guide to trachoma control in programmes for the prevention of blindness. World Health Organization, Geneva. 1981.

Harding SP, Mallinson H, Smith JL, et al. Adult follicular conjunctivitis and neonatal ophthalmia in Liverpool eye hospital, 1980-1984. *Eye (Lond).* 1987, 1(Pt 4), 512-521.

John P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Uphadhyey. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001, 79(3), 214-221.

Krech T, Gerhard-Fsadni D, Hofmann N, et al. Interference of *Staphylococcus aureus* in the detection of *Chlamydia trachomatis* by monoclonal antibodies. (Letter) *Lancet.* 1985, i, 1161-1162.

Mannis MJ. Chlamydial diseases. Ed Kaufman HE, Churchill Livingstone 1988, 9, 201-213.

Novak KD, Kowalski RP, Karenchak LM, et al. *Chlamydia trachomatis* can be transmitted by a nonporous plastic surface in vitro. *Cornea.* 1995, 14, 523-526.

Oehme A, Musholt PB, Dreesbach K. Chlamydiae as pathogens – an over-view of diagnostic techniques, clinical features, and therapy of human infections. *Klin Wochenschr.* 1991, 69, 463-473.

Olafsen LD, Storvold G, Melby K. A microbiological study of conjunctivitis with emphasis on *Chlamydia trachomatis*, in northern Norway. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 1986, 64(4), 463-470.

Peipert JF. Clinical Practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med.* 2003, 349(25), 2424-30.

Potts MJ, Paul ID, Roome AP, et al. Rapid diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in patients attending an ophthalmic casualty department. *Br J Ophthalmol.* 1986, 70(9), 677-680.

Rapoza PA, Quinn TC, Terry AC, et al. A systematic approach to the diagnosis and treatment of chronic conjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 1990, 109(2), 138-142.

Reccia R, Del Prete A, Scala A, et al. Direct immunofluorescence and scraping conjunctival cytology in the study of 912 patients affected by microfollicular conjunctivitis. *Ophthalmologica.* 1994, 208(6), 295-297.

Ronnerstam R, Persson K, Hansson H et al. Prevalence of chlamydial eye infection in patients attending an eye clinic, a VD clinic, and in healthy persons. *Br J Ophthalmol.* 1985, 69(5), 385-388.

Salopek-Rabatic J. Chlamydial conjunctivitis in contact lens wearers: successful treatment with single dose azithromycin. *CLAO J.* 2001, 27(4), 209-11.

Schachter J. Chlamydial infections. *New Eng J Med.* 1978, 298, 428-435.

Talley AR, Garcia-Ferrer F, Laycock KA, et al. The use of polymerase chain reaction for the detection of *Chlamydial keratoconjunctivitis*. *Am J Ophthalmol.* 1992, 114(6), 685-692.

Wishart PK, James C, Wishart MS. Prevalence of acute conjunctivitis caused by chlamydia, adenovirus, and herpes simplex virus in an ophthalmic casualty department. *Br J Ophthalmol.* 1984, 68(9), 653-655.

Witcher JP. Clinical diseases. In: Smolin G, Thoft RA eds. *The cornea – scientific foundations and clinical practice.* 3rd ed Boston: Little, Brown and Co. 1994, 282-293.

Corresponding author: Dr. F. Leone
Address: Via Juvarra 19, Torino, ITALY.

Pervenuto il 14/02/2012



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

CENTRO DI RICERCA
PER LA MEDICINA
E IL MANAGEMENT
DELLO SPORT

Direttore Prof. Roberto Verna
Ordinario di Patologia Clinica

BANDI DI CONCORSO PER L'ANNO ACCADEMICO 2013/2014

Il Centro MeMaS promuove, nella Facoltà di Medicina e Odontoiatria per l'anno accademico 2013/2014, i seguenti corsi di Master universitario:

MASTER DI I LIVELLO

in "Progettazione e gestione della ricerca applicata allo sport e performance analysis"

DIRETTORE: **Prof.ssa Cinzia Marchese**

MASTER DI II LIVELLO

in "Management delle Organizzazioni sanitarie"

DIRETTORE: **Prof. Mauro Modesti**

MASTER DI II LIVELLO

in "Sperimentazione clinica"

DIRETTORE: **Prof. Roberto Verna**

LA SCADENZA DEL BANDO È FISSATA AL DICEMBRE 2013,
L'INIZIO DEI CORSI AL GENNAIO 2014

I BANDI SARANNO PUBBLICATI SUL SITO:

www.uniroma1.it/didattica/offerta-formativa/master



