

VOLUME 53
N. 1/2014



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

IL PATOLOGO CLINICO JOURNAL OF MOLECULAR AND CLINICAL PATHOLOGY

Direzione, Amministrazione e Redazione:

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

Via L. Ungarelli, 23 - 00162 Roma

Componente WASPaLM



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 2014

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 53
N. 1/2014

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 **COMUNICATO CONGIUNTO AIPaCMeM-SIMeL**
- 4 **STUDI DI ASSOCIAZIONE STATISTICA: HLA E MALATTIE**
BAROCCI S, BAROCCI F, CRISTALLO A F
- 13 **I TEST DI ISTOCOMPATIBILITÀ E I FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI ANTI-RIGETTO IMPIEGATI NEI TRAPIANTI**
BAROCCI S, CRISTALLO A F
- 26 **L'IMPORTANZA DEI POLIMORFISMI HLA E NON-HLA NEL TRAPIANTO RENALE**
BAROCCI S, CRISTALLO A F
- 39 **DETERMINAZIONE DELL'HCV AG: STUDIO DI CORRELAZIONE CON IL DOSAGGIO DELL'HCV AB E DELL'HCV RNA**
LANEVE M, LENTI A, CONSERVA R
- 43 **SIERODIAGNOSI DI WIDAL-WRIGHT: SCREENING IN AUTOMAZIONE IN PROVETTA SU FREEDOM EVO CLINICAL 150 TECAN**
MICILLO A, RUSSO A, MICILLO G
- 49 **IPOTIROIDISMO IN GRAVIDANZA IN DONNE RESIDENTI IN UNA VALLE APPENNINICA**
OZZOLA G, GASBARRI L, MONTAINI C
- 53 **VITAMINA D: CONTRIBUTO ALLA VALUTAZIONE DELLO STATUS VITAMINICO IN UN CAMPIONE DI POPOLAZIONE SANA DEL NORD EST DELL'ITALIA**
QUALIZZA U, BARBINA G, COLATUTTO A, VENTURELLI F, ORZAN M, TONUTTI E, SALA P, CURCIO F
- 58 **LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE NELLE PATOLOGIE IMMUNITARIE: L'ESEMPIO DELL'ALLERGIA ALIMENTARE**
SARGENTINI V
- 63 **NGAL: MARKER PREDITTIVO DI INSUFFICIENZA RENALE NEI PAZIENTI TRAPIANTATI?**
TUMMILLO D, BENEVENTI R, MAZZITELLI G
- 69 **IL CIOCCOLATO TRA STORIA E SCIENZA**
VERNA R

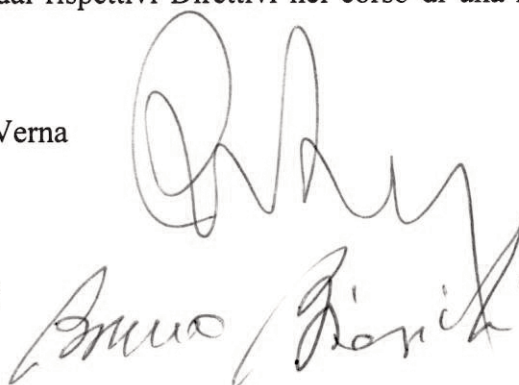
COMUNICATO CONGIUNTO AIPaCMeM-SIMeL

Dopo anni di tentativi, discussioni, trattative e delusioni, sta andando in porto la riunificazione AIPaCMeM-SIMeL. Il momento si può definire storico, perché si ricostituisce quella che è stata la prima, e per tanti anni unica, Società Scientifica dedicata alla Diagnostica di Laboratorio. Il nome proposto è Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio, con acronimo SIPMeL. La soddisfazione è grande, la tessitura avviata con grande pazienza dai Presidenti delle due Società (Bruno Biasioli e Roberto Verna) ha trovato laboriosi ed entusiasti collaboratori nei membri della Commissione Paritetica che ha istruito il lavoro (Milvia Lotzniker, Francesco Curcio, Vittorio Sargentini, Rosarina Impera e Maria Rosaria Andreozzi per AIPaCMeM; Piero Cappelletti, Edoardo Romoli, Pietro Cortese, Luciano Mancini e Mauro Nanni per SIMeL).

Facciamo un po' di storia. Nel settembre 2013, nel corso del Congresso AIPaCMeM di Perugia, il Direttivo AIPaCMeM ha deliberato di invitare ufficialmente SIMeL ad una trattativa per l'unificazione delle due Società, identificando una Commissione istruttoria e dando mandato a Roberto Verna, nella qualità di Presidente, di scrivere al Presidente SIMeL invitandolo a costituire una Commissione analoga, in modo da costituire insieme una Commissione Paritetica che potesse esaminare a fondo la situazione e tentare di risolvere gli eventuali ostacoli. Il Presidente SIMeL ha accettato con entusiasmo l'invito ed è quindi stata costituita la Commissione i cui componenti sono stati già indicati. Le prime due riunioni si sono svolte a Bologna nel novembre 2013 e nel febbraio 2014. Si è subito evidenziata la reciproca convinzione che il momento della riunificazione era giunto e la volontà di andare avanti nell'operazione il più speditamente possibile. Si sono proposte le linee fondamentali del processo di unificazione che si dovrà concludere nel 2015 in occasione del primo Congresso Nazionale della nuova Società, nel corso del quale verranno eletti gli Organi Direttivi. Contestualmente si è ritenuto opportuno proporre ai rispettivi Direttivi di congelare le attuali cariche, regionali e nazionali, in scadenza nel 2014. Le suddette proposte sono state approvate dai Direttivi Nazionali di AIPaCMeM e di SIMeL ai primi di Marzo ed è stato confermato il mandato alla Commissione Paritetica di procedere con la stesura dello Statuto della nuova Società e con la definizione degli aspetti amministrativi e procedurali, legati all'unificazione, che saranno ratificati dai rispettivi Direttivi nel corso di una riunione congiunta nell'autunno 2014.

Per AIPaCMeM, il Presidente Roberto Verna

Per SIMeL, il Presidente Bruno Biasioli

The image shows two handwritten signatures in black ink. The top signature is for Roberto Verna, and the bottom signature is for Bruno Biasioli. Both signatures are fluid and cursive.

11 MAR. 2014

STUDI DI ASSOCIAZIONE STATISTICA: HLA E MALATTIE

¹SERGIO BAROCCI, ¹FEDERICO BAROCCI, ²ATTILIO FABIO CRISTALLO

¹UNI.T.E. Università degli studi di Genova - Area della Facoltà di Medicina e di Scienze M. F. N.

²Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Ospedale Santa Chiara, Trento

Riassunto

Gli studi di linkage e di associazione o caso-controllo rappresentano i due principali tipi di indagini iniziali per la ricerca nel genoma dei geni HLA candidati cioè presumibilmente coinvolti nell'insorgenza di diverse malattie a prevalenza autoimmune. Gli strumenti che si hanno a disposizione per questi tipi di indagini sono costituiti da loci marcatori polimorfici HLA di classe I e di classe II o anche microsatelliti, single-nucleotide polymorphisms e variable number of tandem repeats.

Mentre gli studi di linkage mirano ad identificare quelle regioni cromosomiche che, all'interno di famiglie, tendono ad essere co-ereditate dagli individui affetti, gli studi di associazione verificano invece l'esistenza di una correlazione tra alleli specifici ed una determinata malattia in una popolazione basandosi sulla comparazione delle frequenze alleliche di varianti geniche polimorfiche nei pazienti e nei controlli sani (popolazione di controllo) ma possono essere eseguiti in studi familiari. Tali varianti comprendono frequenze alleliche e aplotipiche che fanno riferimento ai cromosomi oppure frequenze genotipiche che si riferiscono agli individui. In generale, un genotipo è positivamente associato con la malattia, o predisponente, quando è presente in maniera significativamente più frequente nei malati rispetto ai controlli (o nei loro cromosomi nel caso di alleli o aplotipi) mentre è negativamente associato, o protettivo, quando è presente in maniera significativamente più frequente nei controlli rispetto ai pazienti (o nei loro cromosomi nel caso di alleli o aplotipi). Gli studi di associazione sono più sensibili degli studi di linkage e richiedono la conoscenza a priori di regioni geniche candidate e quindi implicate nella patogenesi della malattia. La probabilità di sviluppare la malattia in un individuo positivo per l'allele marker rispetto ad un individuo negativo viene stimata dall'OR (Odds Ratio) o dal RR (Rischio Relativo).

Tra le motivazioni per cui si conducono ancora studi di associazione tra HLA e malattie vi sono il tentativo di comprendere la suscettibilità ai tumori, l'esistenza di marcatori di protezione immunogenetica che possano trovare un impiego clinico per una valutazione dei rischi e del percorso terapeutico e la volontà di ridefinire associazioni HLA già note o di scoprire associazioni con patologie emergenti, alla luce della maggiore conoscenza della mappa genetica del sistema HLA.

Summary

The linkage and association studies or case-control are the two main types of surveys for the search in the genome of HLA genes that candidates involved in the onset of various autoimmune diseases. Actually, the tools that we have available for these types of investigations are made of HLA class I and class II polymorphic markers or microsatellites, single-nucleotide polymorphisms e variable number of tandem repeats.

While linkage studies aim to identify those chromosomal regions that within families, tend to be co-inherited by affected individuals, association studies occur instead the existence of a correlation between specific alleles and a specific disease in a population based on the comparison of allele frequencies of polymorphic gene variants in patients and healthy controls (control population), but can be run in family studies. Such variants include allelic frequencies and haplotype that refer to the chromosomes or genotype frequencies that relate to individuals. In general, a genotype is positively associated with the disease, or predisposing, when present in a significantly more frequent in patients than in controls (or in their chromosomes in the case of alleles or haplotypes) while it is negatively

associated, or protective, when it is present significantly more frequently in the controls compared to patients (or their chromosomes in the case of alleles or haplotypes). Association studies are more sensitive than linkage studies and require a priori knowledge of candidate gene regions and therefore implicated in the pathogenesis of the disease. The probability of developing the disease in an individual positive for the marker allele compared with a negative individual is estimated by OR (Odds Ratio) or RR (relative risk).

Among the reasons why we still lead studies of association between HLA and disease we are trying to understand the susceptibility to tumors, the existence of immunogenetic markers of protection that can find a use for clinical risk assessment and therapeutic process and the desire to redefine HLA associations already known or to discover associations with emerging diseases in the light of increased knowledge of the genetic map of the HLA system.

Introduzione: il significato del termine "associazione"

L'associazione rappresenta il grado di dipendenza statistica tra due o più eventi o variabili. In immuno-genetica il termine indica un'associazione statistica

tra un marcatore genetico e una malattia. Gli approcci per comprendere se un carattere geneticamente controllato o un sistema genetico sia coinvolto nella manifestazione di una malattia sono gli studi di popolazione e gli studi familiari (Thomson, 1981; Barocci et al, 2002). In generale, nel procedimento di valutazione dell'esistenza di una associazione, per esempio tra un allele del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC o HLA nell'uomo) e una malattia, entrano in gioco due variabili: a) la presunta causa (o variabile indipendente) e b) l'effetto (detto variabile dipendente, in quanto subordinato appunto alla variabile indipendente). L'effetto è rappresentato dalla comparsa della malattia e per dimostrare l'esistenza della associazione si confrontano le frequenze della malattia in due popolazioni costituite rispettivamente da soggetti esposti e non esposti ad una presunta causa, o determinante o fattore di rischio (Svejgaard et al, 1974; Barocci et al, 2004). Per esposizione si intende la presenza di un fattore che può ipoteticamente causare un certo effetto. Le domande che ci si pone sono le seguenti:

- la variabile indipendente (presunta causa) è statisticamente associata alla variabile dipendente (effetto)?
- La variabile indipendente è casualmente o non casualmente associata alla variabile dipendente?

Per chiarire meglio il concetto di associazione, immaginiamo di avere l'impressione che un determinato fattore, per esempio uno allele HLA, sia più frequente in un gruppo di malati rispetto a un gruppo di controllo sano: il quesito sarà *“il fattore HLA può essere un elemento predisponente per la malattia in esame?”* e l'obiettivo consisterà nel verificare l'ipotesi dell'esistenza di una associazione, tenendo presente che associazione non è sinonimo di causalità. Infatti, due eventi si definiscono associati solo quando sono correlati in maniera maggiore rispetto a quanto si verifichi per puro caso. Per dimostrare l'esistenza di una associazione e per essere sicuri che le differenze osservate non sono dovute al caso, si ricorre a dei

test statistici non parametrici. La significatività statistica viene determinata generalmente attraverso il test χ^2 per campioni di dimensioni grandi o attraverso il test esatto di Fisher per campioni di dimensioni molto piccole indispensabili entrambi per interpretare i risultati di un confronto (Fig. 1).

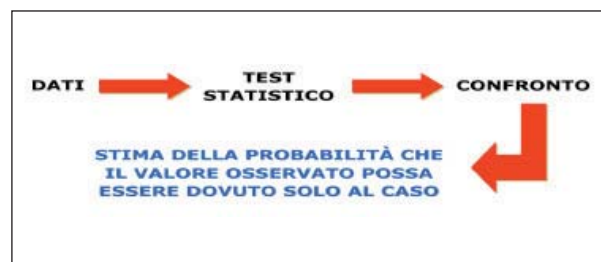


Fig. 1. Razionale per dimostrare l'esistenza di una associazione ed essere sicuri che le differenze osservate non sono dovute al caso.

Forza di una associazione

Per stimare la forza di una associazione si utilizzano delle misure di rischio rispettivamente come il Rischio Relativo (RR) e l'Odds Ratio (OR). RR e OR sono quindi misure di associazione che traducono in termini numerici la forza di legame esistente tra un fattore di rischio e una malattia (Bengtsson and Thomson, 1981; Cristallo et al, 2011).

Il RR viene utilizzato per misurare il rischio di una popolazione rispetto ad un'altra presa come riferimento in studi prospettici. Per un fattore di rischio HLA, l'RR rappresenta per esempio il grado di associazione tra determinati alleli HLA e la malattia. Si ottiene confrontando la frequenza dell'allele in un gruppo di pazienti non imparentati con la frequenza del medesimo nei controlli sani. In immunogenetica RR indica che chi possiede un dato allele HLA ha una probabilità "n volte superiore" (2,4,20, 90...) di contrarre la malattia rispetto ad un soggetto che non esprime il medesimo allele. In generale, le malattie in associazione con i geni HLA possono essere suddivise in tre categorie, malattie infiammatorie, errori ere-

Malattia	Fattore HLA	RR
Spondilite anchilopoietica	B*27	90
Sindrome di Reiter	B*27	37
Psoriasi	C*06:02	13,3
Celiachia	DQ2 =DQA1*05 DQB1*02:01 DQ8 = DQA1*03 DQB1*0302	10,8
Diabete tipo I	DRB1*03:01-DQB1*02:01-DQA1*05:01 DRB1*04 -DQB1*03:02-DQA1*03:01	3,3
Narcolessia	DQB1*06:02	87,4
Sindrome di Behcet	B*51	35

Tab. 1. Associazioni HLA e malattie.

ditari del metabolismo e malattie autoimmuni. La più importante associazione individuata è quella tra spondilite anchilosante (SA) e la specificità sierologica HLA-B27 presente in circa il 90% dei malati verso il 5% dei controlli sani (Caillat-Zucman, 2009; Barocci et al, 2013). Questa specificità sierologica viene riferita a un numero progressivamente crescente di alleli che presentano una prevalenza etnica o razziale molto variabile nei diversi paesi. Sono stati riconosciuti sinora 25 sottotipi dell'HLA-B27 (dall'HLA-B*27:01 all'HLA-B*27:25), e per la maggior parte di essi è stata definita la sequenza aminoacidica. Non tutti i sottotipi predispongono allo stesso modo per la SA nelle diverse popolazioni: i sottotipi B*27:02, B*27:04 e B*27:05 sono quelli maggiormente diffusi nel mondo e maggiormente predisponenti, mentre l'HLA-B*27:06 e l'HLA-B*27:09 non si associano alla (SA). Verosimilmente esiste una gerarchia delle diverse specificità HLA-B27 per la suscettibilità alla malattia. L'OR, pur essendo simile al RR, viene utilizzato per misurare il rischio di una popolazione rispetto ad un'altra negli studi retrospettivi mentre RR negli studi prospettici o studi di coorte. Le più forti associazioni HLA e malattie sono espresse nella Tabella 1.

Studio prospettico: calcolo del rischio relativo

Uno studio prospettico inizia suddividendo la popolazione in esposti e non esposti e poi osservando nel tempo quanti fra gli esposti e quanti fra i non esposti si ammalano.

È possibile definire il RR oltre che come il rapporto fra il rischio nel gruppo degli esposti e il rischio nel gruppo dei non esposti, anche come il rapporto tra l'incidenza negli esposti e l'incidenza nei non esposti (Tabella 2).

$RR = \text{incidenza negli esposti} / \text{incidenza nei non esposti}$
 $RR = [a / (a + b)] / [c / (c + d)]$

	SI MALATTIA	NO MALATTIA
SI ESPOSIZIONE	A	b
NO ESPOSIZIONE	C	d

Tab. 2. Calcolo RR.

In uno studio prospettico sul grado di associazione tra determinati alleli HLA e una malattia, si ricava il RR confrontando la frequenza dell'allele in un gruppo di pazienti non imparentati con la frequenza del medesimo nei controlli sani.

Studio retrospettivo: calcolo dell'odds ratio

Uno studio retrospettivo inizia selezionando i casi e i controlli e poi andando ad accertare quanti fra i casi e quanti fra i controlli sono stati esposti alla presunta causa. L'OR è detto anche rapporto incrociato. Il termine "odds" non ha un corrispondente in italiano ma

può essere reso con l'espressione "probabilità a favore". L'odds, in pratica, corrisponde al rapporto fra il numero di volte in cui l'evento si verifica o si è verificato ed il numero di volte in cui l'evento non si verifica o non si è verificato. Gli odds si utilizzano nel mondo delle scommesse, perché consentono allo scommettitore di calcolare facilmente la somma da incassare in caso di vittoria. Ad esempio, le probabilità di vittoria della nazionale italiana di calcio ai mondiali di Francia del '98 erano date dai bookmakers a 4:1 "a sfavore". Questo equivale a dire che, su una scala da 1 a 5, le probabilità di sconfitta (p) della squadra italiana erano considerate 4 volte più alte di quelle di una sua vittoria (1-p), e quindi la vittoria dell'Italia sarebbe stata pagata 4 volte la cifra scommessa. Ovviamente, gli odds si possono trasformare in probabilità: secondo i bookmakers, l'Italia aveva 1 probabilità su 5 ($p = 0.2$) di vincere e 4 probabilità su 5 di perdere ($p = 0.8$). Da notare che la p di perdere (0,8) è uguale a $1 - p$ di vincere (0,2) e viceversa (Tabella 3).

$$OR = (a/c) / (b/d) = (a/b) \times (d/c) = (a \times d) / (b \times c)$$

	CASI	CONTROLLI
ESPOSTI	A	b
NON ESPOSTI	C	d

Tab. 3. Calcolo OR.

- a: pazienti con fattore HLA presente (esposti)
- b: controlli con fattore HLA presente (esposti)
- c: pazienti con fattore HLA assente (non esposti)
- d: controlli con fattore HLA assente (non esposti)

Interpretazione del rischio relativo e dell'odds ratio

L'interpretazione è identica sia che si tratti di RR che di OR. Entrambi possono assumere valori teorici compresi fra 0 e infinito. È intuitivo che un valore = 1 indica assenza di associazione tra malattia ed esposizione, in quanto testimonia che:

- per il RR, l'incidenza negli esposti è uguale all'incidenza nei non esposti;
- per l'OR, l'odds di esposizione nei casi è uguale all'odds di esposizione nei malati.

Un valore <1 indica una associazione negativa (cioè la presenza del fattore ha un significato protettivo nei confronti della malattia), mentre un rapporto >1 indica l'esistenza di una associazione positiva (il fattore può causare la malattia); valori crescenti indicano associazioni più forti. Prima di dichiarare l'esistenza di un rapporto causa-effetto tra l'esposizione e la malattia, deve essere comunque eseguito un test di significatività statistica, per escludere che la differenza sia dovuta al caso, e devono essere poi verificati i criteri di causalità.

Criteri di causalità

Consistenza

La consistenza di un'associazione richiede che studi

diversi, eseguiti in tempi diversi ed in diverse condizioni sperimentali, evidenzino la stessa associazione.

Forza

Un'associazione fra un presunto determinante di malattia e la malattia medesima può essere più o meno forte. Tale forza può essere quantificata, come visto in precedenza, misurando il RR e l'OR.

Specificità

La specificità misura la costanza con cui una specifica esposizione produce una determinata malattia; ovviamente, più la risposta biologica alla presunta causa è costante, e più è probabile che quest'ultima sia una causa effettiva. Questo criterio è applicabile soprattutto alle malattie infettive.

Temporalità

La temporalità dell'associazione è basata sul semplice ed inoppugnabile principio che ogni causa deve precedere il relativo effetto.

Coerenza

La coerenza può venire definita anche «plausibilità biologica». Essa richiede che la presunta causa sia verosimilmente inquadrabile nel contesto delle conoscenze sull'argomento e sulla patogenesi.

Frazione eziologica

Altro termine importante nello studio di un'associazione è la Frazione Eziologica (EF), cioè la percentuale di casi nell'intera popolazione dovuti al fattore di rischio.

$$EF = [(RR-1) / RR] \times fp$$

fp = frequenza del fattore di rischio nei malati = $a/(a+b)$

$$RR = [a / (a + b)] / [c / (c + d)]$$

Qui di seguito un esempio di calcolo di frazione eziologica, in cui la malattia è la spondilite anchilosante e il fattore di rischio l'HLA B27 (Tabella 4).

$$EF = [(86,5 - 1) / 86,5] \times 0,90 = 3\%$$

Segno dell'associazione

L'associazione può essere positiva o negativa. Il segno dell'associazione viene calcolato dalla tabella 2 x 2 come: $ad - bc$

a: pazienti con fattore HLA presente (esposti)

b: controlli con fattore HLA presente (esposti)

c: pazienti con fattore HLA assente (non esposti)

d: controlli con fattore HLA assente (non esposti)

se il segno è positivo, i due fattori, marker HLA e malattia, sono correlati positivamente

se il segno è negativo i due fattori (marker HLA e malattia) sono correlati negativamente

Comparazione delle frequenze alleliche (geniche) in luogo delle frequenze genotipiche

Diversi immunogenetisti paragonano la frequenza allelica o genica al posto della frequenza fenotipica. L'effetto che ne risulta è un aumento del test di significatività, poiché ciascun individuo studiato conta due volte quando vengono confrontate le frequenze geniche e una sola volta nel confronto dei fenotipi. Questo aumento è dovuto al numero di osservazioni (da N pazienti a 2N geni). È raccomandabile che i test di significatività siano eseguiti a livello fenotipico, poiché non sono i geni come tali ma i loro prodotti che causano predisposizione o protezione verso le malattie.

Il fenomeno del linkage

Negli studi familiari può emergere il fenomeno del linkage, cioè di una associazione fra geni che possono indurre a pensare che una malattia sia correlata per esempio a due geni HLA di loci diversi. L'associazione è in realtà con uno solo dei due geni, ma il linkage disequilibrium fa apparire l'associazione anche con il secondo gene. La procedura statistica del χ^2 o del test esatto di Fisher permette di stabilire quali fra i due geni o più geni può essere considerato responsabile dell'associazione.

Tabelle di contingenza

Le tabelle di contingenza sono un particolare tipo di tabelle a doppia entrata (cioè tabelle con etichette di riga e di colonna), utilizzate in statistica per rappresentare e analizzare le relazioni tra due o più variabili. Trattandosi del confronto tra due differenti campioni con risposte alternative di tipo binario, la tabella costruita con i dati sperimentali è chiamata tabella 2 x 2 (un esempio di applicazione è riportato più avanti).

	Fattore HLA +	Fattore HLA -	Totale
pazienti	A	B	a + b
controlli	C	D	c + d
totale	a + c	b + d	a + b + c + d
	Fattore HLA +	Fattore HLA -	Totale
Pazienti con SA	108	12	120
Controlli sani	311	2290	3301
totale	419	3002	3421

Tab. 4. Calcolo frazione eziologica.

Grado di libertà

È il minor numero dei parametri indipendenti tramite i quali si può individuare un sistema: in matematica una funzione di secondo grado rappresentata in un sistema di assi cartesiani (x,y) ha due gradi di libertà. In fisica per descrivere un punto nello spazio si fa riferimento alla terna x,y,z (3 gradi di libertà), ma se il punto è in movimento si deve considerare un altro parametro, il tempo oppure la velocità, ma non entrambi perché la velocità è funzione del tempo. In senso generale, il numero di gradi di libertà di un sistema è dato dal numero di valori che possono arbitrariamente essere modificati purché il risultato resti costante (Dyer and Warrens,1994).

grado di libertà = $(r - 1)(c - 1)$;

dove r = righe, c = colonne.

Test chi quadrato o χ^2

È uno dei test di verifica d'ipotesi: i risultati ottenuti, analizzando dei campioni, non sempre concordano esattamente con i risultati teorici attesi secondo le regole di probabilità, anzi, è ben raro che questo si verifichi. Benché considerazioni teoriche portino ad attendere che da 100 lanci di una moneta escano 50 teste e 50 croci, è raro che questo risultato si verifichi, ma nonostante questo non si deve per forza dedurre che la moneta sia truccata. Nel test del χ^2 , qualsiasi sia la differenza esistente tra due percentuali o due proporzioni da confrontare, si avanza l'ipotesi zero H_0 : l'ipotesi zero o ipotesi nulla H_0 afferma semplicemente che la differenza osservata, di qualsiasi entità essa sia, è dovuta al caso. Tale ipotesi può essere accettata oppure rifiutata sulla base del test statistico (Hawkins, 1981).

Il test del χ^2 è utilizzabile quando il valore contenuto in ogni cella di una tabella 2 x 2 di contingenza è >5 con un numero totale di osservazioni >30 ; le entrate delle tabelle 2 x 2 devono essere frequenze e non valori medi. In caso contrario deve essere utilizzato il test esatto di Fisher o il test delle probabilità esatte di Fisher. Il test del χ^2 indica la misura in cui le frequenze osservate in ogni cella della tabella 2 x 2 differiscono dalle frequenze che ci aspetteremmo se non ci fosse associazione fra i contenuti che definiscono le righe. Inoltre, il test verifica se esiste una relazione tra la variabile che distingue le righe e la variabile che distingue le colonne. Il test può essere considerato come una misura degli scostamenti tra frequenze attese e frequenze osservate: all'aumentare di questi scostamenti aumenta il valore del χ^2 . La sua distribuzione teorica è una distribuzione compresa tra 0 e $+\infty$ e la sua forma varia al variare dei gradi di libertà (dei dati effettivamente disponibili per valutare la quantità di informazione contenuta nella statistica). In realtà, la sua distribuzione è discontinua e tende alla continuità solo al tendere all'8 del campione considerato: il valore massimo che può raggiungere è legato a questa dimensione. Lo scopo del test χ^2 è quello di conoscere se le frequenze osservate differi-

scono significativamente dalle frequenze attese. Se $\chi^2=0$, le frequenze osservate coincidono esattamente con quelle attese. Se invece $\chi^2>0$, esse differiscono. Più grande è il valore di χ^2 , più grande è la discrepanza tra le frequenze osservate e quelle teoriche.

Nella pratica le frequenze teoriche vengono calcolate sulla base di un'ipotesi zero (H_0 , la differenza è dovuta al caso). Se sulla base di questa ipotesi il valore calcolato di χ^2 è più grande di un certo valore critico si conclude che le frequenze osservate differiscono significativamente dalle frequenze attese e si rifiuta H_0 al corrispondente livello di significatività. Altrimenti la si accetta, o almeno non la si rifiuta. Il test saggia se le differenze tra le frequenze osservate e quelle attese siano troppo grandi perché siano attribuibili al caso. Il test controlla le differenze in tutte le celle.

Se per esempio si imposta una tabella di contingenza di 2 righe e di 2 colonne (1 grado di libertà $(2 - 1) \times (2 - 1)$) per il calcolo del χ^2 (Tabelle 5 e 6) si applica la seguente formula:

$$\chi^2 = [(ad - bc)^2 n] / (a+b) \times (a+c) \times (b+d) \times (c+d)$$

	Fattore HLA +	Fattore HLA -	Totale
Pazienti	A	b	a+b
Controlli	C	d	c+d
Totali	a + c	b + d	a+b+c+d

Tab. 5. Calcolo del χ^2 .

Costruzione di una tabella di contingenza 2 x 2 e calcolo del χ^2

Quando si confrontano due campioni indipendenti è utile costruire una tabella a doppia entrata chiamata tabella di contingenza, in cui i risultati sono prodotti dall'incontro di due serie di fattori o caratteristiche. Per ognuno dei due gruppi deve essere riportato il conteggio di risposte binarie (numero di una caratteristica X ed Y oppure il numero di successi e insuccessi). Trattandosi del confronto tra due differenti campioni con risposte alternative di tipo binario, la tabella costruita con i dati sperimentali è chiamata tabella 2 x 2.

	Fattore HLA +	Fattore HLA -	Totale
Pazienti	33	35	68
Controlli	52	155	207
Totali	85	190	275

Tab. 6. Calcolo del χ^2 .

Non esiste uniformità su come costruire una tabella. La convenzione seguita è quella proposta da H. Zeisel nel 1947: le due modalità della variabile casuale sulle colonne oppure le due modalità della variabile

effetto sulle righe. Un'altra convenzione generalmente seguita è quella di indicare le frequenze riportate in ognuna delle quattro celle con le lettere a,b,c,d. Il totale generale dei dati è indicato con N.

Il procedimento logico è quello di confrontare le percentuali in cui è presente o assente il fattore HLA:

- Fattore HLA presente: $a/(a+c) = 33/85 = 0.38$
- Fattore HLA assente: $b/(b+d) = 35/190 = 0.18$
- Ipotesi zero H_0 : la differenza osservata fra le due percentuali (0.38 vs. 0.18) è dovuta al caso?
- In base ai dati, è possibile accettare o respingere H_0 ?

Applico il test del chi quadrato; $\chi^2 = 13,13$ con 1 grado di libertà. In questo caso il valore del χ^2 è maggiore delle probabilità 5% e 1% (rispetto ai valori di p o probabilità riportati in una apposita tabella, che sono rispettivamente 3,841 e 6,635); il confronto tra il risultato del χ^2 e il valore di p o probabilità della tabella dei valori di probabilità (Fig. 2) consente di stabilire se i valori osservati siano o meno in accordo con l'ipotesi iniziale.

Gradi di libertà	Probabilità			
	0,10 10%	0,05 5%	0,01 1%	0,001 0,1%
1	2,71	3,84	6,53	10,83
2	4,60	5,99	9,21	13,81
3	6,25	7,81	11,34	16,27
4	7,78	9,49	13,28	18,46
5	9,24	11,07	15,09	20,52
6	10,64	12,59	16,81	22,46
7	12,02	14,07	18,47	24,32
8	13,36	15,51	20,09	26,12
9	14,68	16,92	21,67	27,88
10	15,99	18,31	23,21	29,59
11	17,27	19,67	24,72	31,26
12	18,55	21,03	26,22	32,91
13	19,81	22,36	27,69	34,53
14	21,06	23,68	29,14	36,12
15	22,31	24,99	30,58	37,70
16	23,54	26,30	32,00	39,25
17	24,77	27,59	33,41	40,79
18	25,99	28,87	34,80	42,31
19	27,20	30,14	36,19	43,82
20	28,41	31,41	37,57	45,31

Fig. 2. Tabella dei valori di probabilità.

Esempio di calcolo del χ^2 nell'associazione HLA e malattia:

- Ipotesi nulla H_0 : tra i due gruppi esaminati in base al parametro fattore HLA +, non c'è associazione statistica.
- La stima migliore perché sia valida H_0 è data dalla somma degli individui fattore HLA + nei due gruppi.
- $(a+c)/N = (33+52)/275 = 0,31$.
- Considerando che i due campioni a confronto hanno un numero differente di osservazioni, nel caso che H_0 sia vera, nel primo campione (pazienti) di 68 soggetti dovremo aspettarci di trovare 21,08 individui con fattore HLA+ ($0,31 \times 68$) e nel secondo campione (controlli) di 207 soggetti di trovarne 64,17 ($0,31 \times 207$).

I valori attesi si possono presentare in una nuova tabella 2 x 2. Per la sua costruzione è utile riportare dapprima i 4 totali marginali e il totale generale. Per

calcolare le frequenze attese è necessario conoscere il totale di riga, il totale di colonna (N) e il totale generale (Tabelle 7 e 8).

$a = (a+b) \times (a+c) / N = 68 \times 85 / 275 = 21$
$b = (a+b) \times (b+d) / N = 68 \times 190 / 275 = 47$
$c = (c+d) \times (a+c) / N = 207 \times 85 / 275 = 64$
$d = (c+d) \times (b+d) / N = 207 \times 190 / 275 = 143$

Tab. 7. Calcolo dei totali per il calcolo del χ^2 con le frequenze attese.

	Fattore HLA +	Fattore HLA -	Totale
Pazienti	21	47	68
Controlli	64	143	207
Totali	85	190	275

Tab. 8. Calcolo del χ^2 con le frequenze attese.

Poiché i dati sono quattro, ne deriva che i gdl = 1:

$$(r-1)(c-1) = (2-1)(2-1) = 1$$

Stimata la distribuzione attesa nell'ipotesi che sia vera H_0 , dalle differenze osservate e attese si calcola il valore del χ^2 mediante la formula estesa:

$$\chi^2 = (33-21)^2 / 21 + (35-47)^2 / 47 + (52-64)^2 / 64 + (155-143)^2 / 143 = 13,13$$

Metodo alternativo alla formula estesa:

$$\chi^2 = \frac{[(a \times d - b \times c)^2 / N]}{[(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)]}$$

$$\chi^2 = 13,13 \quad \text{valore di } p < 0,001$$

Valutazione finale del test statistico

La differenza fra i gruppi malati / controlli per quel fattore HLA è statisticamente significativa a livello di probabilità per $p < 0,001$. Il valore calcolato 13,13 è maggiore della probabilità 5% e anche di quella 1%. Di conseguenza, si rifiuta H_0 in quanto si ha il 99,99% di probabilità che la differenza per quel fattore HLA tra malati e controlli non sia dovuta al caso, accettando l'ipotesi alternativa. La procedura per il calcolo delle frequenze osservate e attese pur richiedendo più tempo con la formula estesa, è utile per comprendere il reale significato del test del χ^2 nella tabella 2 x 2. Il confronto tra la distribuzione osservata ed attesa mostra in quali caselle si trovano le differenze più importanti. Negli individui con malattia si riscontra il fattore HLA + con maggiore frequenza rispetto alla popolazione generale e la sua presenza si associa ad un rischio maggiore di sviluppare la malattia. Si può ottenere lo stesso risultato ricorrendo alla formula abbreviata. Il calcolo fornisce un valore di χ^2 identico a quello calcolato con la formula estesa. La formula abbreviata è da preferire

per il calcolo perché richiede meno tempo mentre la formula generale è utile nell'interpretazione dei dati.

Correzione di Yates

Si utilizza quando le frequenze attese sono basse (sempre > 5), in genere per piccoli campioni (numero totale compreso tra 30 e 100) (Haviland, 1990):

$$\chi_c^2 = \frac{[(a \times d - b \times c) - N/2]^2 N}{[(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)]}$$

$$\chi_c^2 = 12,56$$

Con la correzione di Yates, la conclusione non cambia: si rifiuta l'ipotesi H_0 . Gli effetti di questa correzione sono tanto maggiori quanto più basso è il numero di osservazioni.

Gli errore di tipo I e di tipo II

Errore di tipo I: errore che si commette rifiutando l'ipotesi H_0 quando in realtà è vera. Per esempio quando si postula un'associazione che in realtà non esiste. Errore di tipo II: errore che si commette accettando l'ipotesi H_0 quando in realtà è falsa. Per esempio in presenza di deboli associazioni dovute ad un piccolo numero di campioni quando in realtà sono vere.

Gli errori di tipo I sono molto comuni nello studio HLA e malattie, a causa del grande numero di alleli HLA.

Correzione del valore di probabilità

Quando si generano tabelle 2 x 2 per ciascun allele HLA, si originano molti valori di probabilità. La probabilità che uno o più di questi valori di p sia statisticamente significativo è abbastanza alta. Ad esempio: se si studiano 20 alleli HLA e uno di questi mostra un $p < 0,05$, tutti i valori di p ottenuti devono essere corretti per il numero di confronti effettuati ($0,05 \times 20 = 0,1$ quindi p non significativo) (Thomson, 1981; Svejgaard et al, 1994):

non è un evento raro: $p < 0,05$;

è un evento più convincente: $p < 0,01$;

è un evento abbastanza significativo: $p < 0,001$.

Le deviazioni casuali sono molto frequenti, in particolare effettuando ad esempio 100 confronti, almeno uno di questi dovrà essere significativo a livello dell'1% o del 5%.

pc = valore di p originale x il numero di confronti

Altro esempio: un marker HLA devia con un $p < 0,00066$. Gli alleli HLA studiati sono stati 40; ne consegue che $pc = 40 \times 0,00066 = 0,026$.

Se sono stati studiati due gruppi di pazienti, si avrà: $pc = 40 \times 0,00066 \times 2 = 0,052$ con valore di p = non significativo.

È necessario moltiplicare il valore di p ottenuto per il numero di comparazioni per il tasso di errore che si può incorrere specie negli studi in cui si confrontano più gruppi di pazienti, nel test multiplo (analisi dei sottogruppi) per evidenziare delle caratteristiche par-

ticolari dei dati, e nelle analisi ad interim (analisi eseguite nel corso di un trial clinico per mettere in evidenza una superiorità marcata di uno dei trattamenti, con conseguente interruzione precoce dello studio).

Per aggiustare il p esistono diverse procedure (Bland and Altman, 1995):

$$p_{\text{corretto}} = k \times p$$

dove k = numero di comparazioni.

Sino ad un recente passato, molti immunogenetisti correggevano il p per il numero di alleli testati a ciascun locus: questa era una procedura errata.

Per esempio se si studiano 21 alleli con metodica PCR-SSP "low resolution" al locus HLA-A*, 42 al locus HLA-B* e 14 al locus HLA-DRB1* i valori di p non devono essere corretti per i 21 alleli del locus A*, i 42 del locus B* e i 14 del locus DRB1* ma per tutti gli alleli testati ossia 77.

Se vengono analizzati 50 alleli HLA in uno studio di associazione in due gruppi di individui (malati e controlli), è necessario eseguire la correzione $50 \times 2 = 100$ per i valori di p ottenuti significativi.

Test esatto di Fisher

È un test per la verifica d'ipotesi utilizzato nell'ambito della statistica non parametrica, in situazioni con due variabili nominali divise ciascuna in due categorie (con 1ª variabile positiva o negativa) e una 2ª variabile presente o non presente. Si utilizza per campioni molto piccoli quando la frequenza attesa è < 5 ed il numero delle osservazioni è compreso fra 20 e 40.

La probabilità del verificarsi di una certa distribuzione di frequenza, una volta stabiliti i totali marginali, è data dalla formula riportata nella figura 3.

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{N!a!b!c!d!}$$

Fig. 3. probabilità di osservare i valori dati qualora fosse vera l'ipotesi nulla H_0 ; per convenzione, $1! = 0!$ e $0! = 1$.

Esempi:

$$4! = 4 \times 3 \times 2 \times 1 = 24$$

$$3! = 3 \times 2 \times 1 = 6$$

Per verificare se i valori dati sono diversi da quanto previsto dall'ipotesi nulla, si sommano le probabilità di quanto osservato e di tutti i casi più estremi. La somma di queste probabilità e delle probabilità di ottenere combinazioni più estreme dei dati in esame è il valore di p.

Anche per il test di Fisher si utilizza una tabella di contingenza 2 x 2 nella quale si annotano le lettere a, b, c e d ad indicare i valori nelle celle ed N la somma totale. Il calcolo del test esatto di Fisher è molto laborioso ed in genere è necessario ricorrere a software statistici. Il test può essere a una coda od unilaterale (one - tailed) oppure a due code o bilaterale (two-tailed):

- a una coda: il valore di p riguarda la direzione dell'associazione osservata (che la probabilità della serie A sia maggiore della serie B; nel nostro caso un aumento del fattore HLA nei pazienti).
- a due code: il valore di p può essere ottenuto semplicemente moltiplicando il valore di p ottenuto ad una coda x 2.

In generale, il test viene eseguito a due code.

Conclusioni

Gli studi di associazione si propongono di affinare le conoscenze tra associazioni già descritte o emergenti alla luce della mappa genetica del sistema HLA, il più complesso sistema genetico noto.

Le correlazioni che probabilmente intercorrono fra gli alleli HLA e alcune malattie e che si possono rivelare utili ai fini dell'inquadramento diagnostico sono di due tipi:

- una in cui il gene responsabile della malattia viene ereditato in linkage (associazione) con alcuni alleli HLA, come accade per esempio nella narcolessia;
- un'altra in relazione al meccanismo immunopatologico di presentazione delle molecole dell'istocompatibilità con rottura della tolleranza in seguito alla presentazione di un peptide autologo da parte di un allotipo particolare della classe I e II; la perdita della tolleranza potrebbe essere dovuta alla somiglianza fra un peptide autologo e un peptide esogeno, per esempio batterico. I cloni T autoreattivi possono rivelarsi direttamente patogeni o stimolare indirettamente la produzione di autoanticorpi patogeni; questo meccanismo è, semplificando, alla base della spondilite anchilosante, della malattia celiaca e della sindrome di Behcet.

Ci sono anche altri numerosi esempi apparsi di recente che alcune associazioni HLA sono in realtà non dovute ai geni HLA, come l'emocromatosi (gene HFE) e l'iperplasia surrenalica congenita (gene CYP21A2) che in origine sembravano presentare associazioni con alleli HLA.

Occorrono due differenti approcci per comprendere se un carattere geneticamente controllato o più genericamente un sistema genetico, in questo caso il sistema HLA, sia coinvolto nella manifestazione di un altro carattere, in particolare di una malattia. Uno consiste in studi di popolazione in cui le frequenze degli alleli HLA osservate in un gruppo di affetti non consanguinei vengono confrontate con quelle osservate in un gruppo di controllo costituito da individui sani: da questo tipo di studi si possono ottenere solamente risultati che indicano la presenza o l'assenza di una associazione statistica fra malattia e uno o più alleli HLA. Gli studi di popolazione dal punto di vista pratico sono i più semplici da condurre ma portano solo a risultati quando esiste un linkage disequilibrium tra gene predisponente o determinante la malattia e HLA.

Il secondo approccio è lo studio familiare (tra genitori e figli o tra gruppi di fratelli) e permette di indivi-

duare l'esistenza di un concatenamento anche in assenza di linkage disequilibrium (Mattiuz et al, 1971). Permette anche di calcolare qualora vi sia concatenamento la più verosimile distanza di ricombinazione fra locus "malattia" e HLA. Infine, permette di soppesare quale fra recessiva e dominante sia la più probabile modalità di trasmissione della malattia.

In ultimo, la sfida futura per gli studi di associazione sarà quella di sfruttare le informazioni derivanti dall'identificazione di nuove varianti alleliche HLA associate alla risposta dell'organismo nei confronti di alcuni farmaci. Recentemente, diversi allotipi del locus HLA-B* sono risultati essere associati con le reazioni avverse a determinate droghe o farmaci. Ad esempio, individui portatori dell'allele HLA-B*1502 presentavano un maggior rischio di sviluppare la Sindrome di Stevens-Jonson in risposta al trattamento con carbamazepina (Lonjou et al, 2008) mentre la presenza dell'allele HLA-B*5801 risultava essere associata ad un aumentato rischio di effetti collaterali cutanei in pazienti trattati con allopurinolo (Cristallo et al, 2011). Un'altra variante allelica come l'HLA-B*5701 risultava essere invece associata con una massiccia sensibilità al trattamento con abacavir, un farmaco in grado di ritardare la diffusione del virus HIV-1 nel corpo (Norcross et al, 2012). Si renderà necessario sviluppare test rapidi ed economici in modo che le decisioni circa la prescrizione di farmaci siano prese in maggiore sicurezza e senza ritardi.

Bibliografia

- Barocci S., Fiordoro S., Miotti V., Santori G., Barocci F., De Pascale A. Assenza di correlazione statistica tra eterodimeri diabetogeni HLA-DQ e diabete di tipo 2: analisi familiare. *J of Mol and Clin Pathol* 2002 (1-2): 44-52.
- Barocci 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.
- Barocci S., Antonelli P., Cristallo A.F. "Meccanismi molecolari dell'associazione HLA e malattie autoimmuni". *J of Mol and Clin Pathol* 2013; 51: 23-32.
- Bengtsson BO, Thomson G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens* 1981; 18(5):356-363.
- Bland J.M., Altman D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 1995; 310: 170.
- Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2009; 73 (1): 1-8.
- Cristallo A.F., Schroeder J., Citterio A., Santori G., Ferrioli G.M., Rossi U., Bertani G., Cassano S., Gottardi P., Ceschini N., Barocci F., Ribizzi G., Cutrupi V., Cairoli R., Rapisarda V., Pastorello E.A. and Barocci S. A study of HLA class I and class II 4-digit allele level in Stevens-Johnson syndrome and

toxic epidermal necrolysis. *Int. J. of Immunogenetics* 2011; 303-309.

Dyer P, Warrens A. Appendix: statistical notes. In: Lechler R, ed. *HLA and Disease*, London: Academic. Press, 1994: 113-121.

Haviland M.G. Yates's correction for continuity and the analysis of 2 x 2 contingency tables. *Statistics in Medicine* 1990; 9: 363-367.

Hawkins B.R. Table of critical Chi square values for investigations involving multiple comparisons. *Tissue Antigens* 1981; 17 (2): 243-244.

Lonjou C, Borot N, Sekula P, Ledger N, Thomas L, Halevy S, Naldi L, Bouwes-Bavinck JN, Sidoroff A, de Toma C, Schumacher M, Roujeau JC, Hovnanian A, Mockenhaupt M; RegiSCAR study group. In: A European study of HLA-B in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. *Pharmacogenetics and Genomics* 2008; 18(2), 99-107.

Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, Ceppellini R, Bodmer WF. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: Terasaki P, ed. *Histocompatibility Testing* 1970, Copenhagen: Munksgaard, 1971: 193-205.

Norcross MA, Luo S, Lu L, Boyne MT, Gomarteli M, Rennels AD, Woodcock J, Marguilies DH, McMurtrey C, Vernon S, Hildebrand WH, Buchli R.

In: Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B*57: 01: an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity. *AIDS* 2012; 26(11): 21-29.

Svejgaard A, Jersild C, Nielsen LS, Bodmer WF. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens*. 1974; 4(2): 95-105
Svejgaard, L. P. Ryder. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43: 18-27.

Thomson G. A review of theoretical aspects of HLA and disease associations. *Theoretical Population Biology* 1981; 20 (2):168-208.

Zeisel H. Say it with figures, Harper & Row, New York 1947; tradotto in italiano in Ditele coi numeri, Marsilio editore, 1968).

Address correspondence to:

Prof. Sergio Barocci

Via A. Robino 87/8,

16142 Genova

e-mail: sergiobarocci@gmail.com

Pervenuto il 28/12/2013

I TEST DI ISTOCOMPATIBILITÀ E I FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI ANTI-RIGETTO IMPIEGATI NEI TRAPIANTI

¹SERGIO BAROCCI, ²ATTILIO FABIO CRISTALLO

¹UNI.T.E. Università degli studi di Genova - Area della Facoltà di Medicina e di Scienze M. F. N.

²Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Ospedale Santa Chiara, Trento

Riassunto

I laboratori di istocompatibilità forniscono un valido aiuto ai programmi di trapianto di organi solidi e di cellule staminali attraverso la realizzazione di una ampia gamma di test finalizzati alla valutazione dello stato immunologico dei pazienti su cui effettuare il trapianto e all'identificazione di potenziali donatori d'organo. Per l'identificazione degli antigeni HLA e degli anticorpi anti-HLA e per la valutazione del grado di compatibilità, si ricorre a test sierologici e molecolari. L'approccio molecolare è in grado di definire con maggiore accuratezza gli antigeni di istocompatibilità in caso di trapianto rispetto al test sierologico di linfocitotossicità; ciò comporta una migliore valutazione del grado di compatibilità nella coppia donatore/ricevente e la riduzione dei casi di rigetto del trapianto nell'organismo ospite. In questa rassegna sono illustrati i principali test di istocompatibilità per il trapianto di organi solidi e per quello di cellule staminali ed i farmaci immunosoppressivi attualmente in uso.

Summary

Histocompatibility laboratories provide valuable assistance to programs of solid organ and stem cells transplants through the creation of a wide range of tests designed to evaluate the immunological status of patients on which to perform the transplant and identification of potential organ donors. For the identification of HLA antigens and anti-HLA antibodies and to evaluate the degree of compatibility, we resort to molecular and serological tests. The molecular approach is able to define with greater accuracy histocompatibility antigens in the case of transplantation compared to the serological test lymphocytotoxicity; this involves a better assessment of the degree of compatibility in pair donor/recipient and the reduction of cases of transplant rejection in the host organism. This review shows the main histocompatibility transplant tests for solid organ and for stem cells and the immunosuppressive drugs currently in use.

prodotti proteici dei geni di classe III non sono implicati nella presentazione peptidica, sebbene rivestano rilevanza immunologica e includono il tumor necrosis factor (TNF), le heat shock proteins (HSP) e alcuni costituenti del sistema del complemento come C2, C4 e FB o properdina (Fig.1).

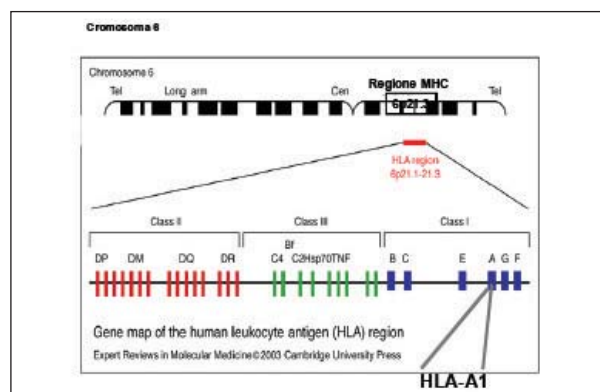


Fig. 1. Mappa dell'MHC o sistema HLA nell'uomo.

Introduzione

Gli antigeni leucocitari umani (HLA) sono glicoproteine eterodimeriche costituite da una catena pesante e da una catena leggera. I geni che codificano queste molecole sono stati individuati all'interno del complesso cromosomico principale di istocompatibilità (MHC) localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (Campbell and Trowsdale, 1993). L'MHC misura approssimativamente 4×10^6 coppie di basi del DNA del genoma e codifica almeno 200 differenti geni. Questa regione genetica è divisa in tre gruppi designati come classe I, classe II e classe III. Gli antigeni HLA-A, HLA-B e HLA-C appartengono al gruppo classe I mentre gli antigeni HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP appartengono al gruppo classe II. La catena β leggera delle molecole di classe I, β -2 microglobulina, è invece codificata sul cromosoma 15. I

Gli antigeni HLA sono proteine immunologicamente attive espresse in un tipo di tessuto specifico sulla superficie cellulare (Jackson and Peterson, 1994). Questi antigeni operano presentando al T cell receptor (TCR) frammenti proteici o peptidi elaborati nel citoplasma. Le cellule T sono istruite precocemente nel corso della vita durante la loro maturazione nel timo relativamente a quali siano i peptidi e le molecole HLA associate di cui sono costituite, il "self". Se il complesso peptide-HLA rilevato dal TCR non viene riconosciuto come proprio costituente, "non self", può scatenarsi una risposta immunologica che ha come risultato la produzione di anticorpi da parte delle cellule B e/o l'attivazione citotossica delle cellule T diretta verso la sorgente della proteina estranea. Le sorgenti di peptidi non riconosciute come proprie in-

cludono le proteine batteriche e virali, le proteine derivanti da trasfusioni o da tessuti trapiantati e gli antigeni paterni espressi sul tessuto fetale.

Il solco o tasca degli antigeni HLA che legano il peptide rappresenta una delle più importanti caratteristiche di queste molecole. Gli aminoacidi collocati nelle posizioni chiave della tasca interagiscono direttamente con gli aminoacidi dei frammenti peptidici consentendo che soltanto quei peptidi che abbiano configurazioni aminoacidiche appropriate siano trattenuti per la presentazione alle cellule T.

Gli antigeni HLA perciò selezionano l'assortimento di peptidi presentabili alle cellule T. Il solco che lega il peptide e che appartiene alle molecole di classe I è costituito da una struttura continua di esoni 2 e 3 codificanti per una catena α pesante. Questa tasca è quasi concentrica e può contenere un peptide di 9-12 aminoacidi in lunghezza. La tasca delle molecole di classe II è discontinua ed è formata dall'associazione dei prodotti dell'esone 2 delle catene α e β . Ciascuna catena contribuisce con una α -elica più una base β con struttura a foglietto ripiegato. A causa di questo ordinamento strutturale, la tasca è aperta in fondo e può contenere un peptide di lunghezza più grande (Madden, 1995; Janeway and Travers P, 1996).

Gli antigeni HLA sono molecole altamente polimorfiche con una ricca storia evolutiva. Il polimorfismo è per definizione una variazione del nucleotide di un gene che, nella maggior parte dei casi non crea danno alla funzione della proteina per la quale esso codifica variando solo lievemente il suo contenuto in aminoacidi. Alcune variazioni dei nucleotidi riferite come polimorfismi silenti, dovuti all'abbondanza del codice genetico, non cambiano il contenuto degli aminoacidi. Il più elevato numero di polimorfismi è stato individuato negli esoni 2 e 3 per le molecole HLA di classe I e nell'esone 2 per le molecole HLA di classe II, proprio nella regione del solco legante il peptide. Sembra che i polimorfismi si verifichino attraverso un certo numero di meccanismi che includono la "point substitution", la ricombinazione del gene e la conservazione del gene. Le forme alternative di un gene le cui variazioni sono dovute ai polimorfismi del nucleotide sono dette alleli. Sono stati individuati differenti alleli caratterizzanti gruppi etnici e razziali in ogni parte del mondo. Attualmente, grazie alla disponibilità delle tecnologie di sequenza del DNA, il numero degli alleli identificati *ex novo* nella popolazione è aumentato notevolmente (www.allele-frequencies.net). Il Comitato sulla Nomenclatura HLA della Organizzazione Mondiale della Sanità riporta al luglio 2013 un elenco di 8016 alleli HLA.

Ogni individuo eredita due set di alleli HLA, uno da ciascuno dei genitori (Lee, 1990). A causa della stretta vicinanza di questi geni sul cromosoma, ciascun set è ereditato come un gruppo chiamato aptotipo (Fig. 2). Il linkage tra questi loci di geni è molto stretto con una incidenza dell'1%-2% della ricombinazione fra l'HLA-A e l'HLA-C oppure l'HLA-B e l'H-

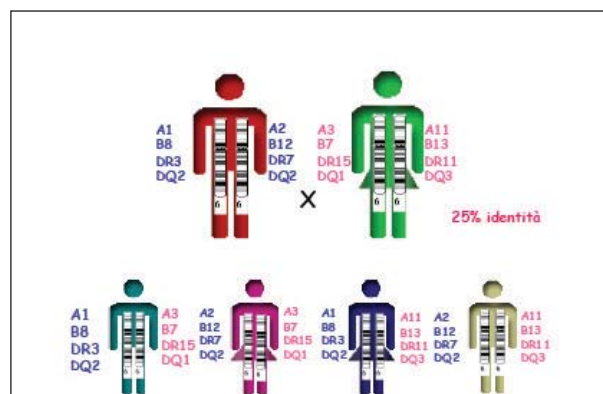


Fig. 2. I prodotti HLA tendono ad essere ereditati "in blocco" come aptotipi.

LA-DR oppure l'HLA-DR e l'HLA-DQ e ancora l'HLA-DQ e l'HLA-DP. Questi alleli sono ereditati secondo le leggi di Mendel e i loro prodotti proteici antigenici sono espressi in maniera codominante sulla superficie cellulare. In aggiunta, i fratelli hanno il 50% delle possibilità di condividere un aptotipo HLA con i loro genitori e solo un 25% ha la possibilità di condividere due aptotipi HLA identici. La percentuale di ricombinazione dell'HLA-DP è significativamente più alta come se i geni di questo antigene si trovassero ad una distanza considerevole dai rimanenti. Il significato immunologico dei prodotti proteici per l'HLA-DP così come per l'HLA-C è ancora controverso e non vengono attualmente considerati essenziali nella ricerca della compatibilità HLA nei trapianti di organi solidi e quindi non annoverati tra le analisi di routine nei laboratori di istocompatibilità.

Metodi di analisi per la compatibilità

Il laboratorio deve fornire informazioni mirate a ridurre al minimo il rischio di insorgenza del rigetto iperacuto nei trapianti di organi solidi e l'inizio di una grave malattia acuta del trapianto contro l'ospite in quelli di midollo osseo: per ottemperare a ciò è necessario:

- valutare il grado di compatibilità tra donatori/riceventi sulla base degli antigeni HLA mediante metodiche sierologiche e molecolari;
- monitorare ogni tre mesi e 15 giorni dopo ogni trasfusione di sangue i pazienti per la presenza di anticorpi preformati contro gli antigeni HLA;
- effettuare tutti quei test per la valutazione del grado di compatibilità mediante l'uso di popolazioni cellulari (linfociti T e B) e sieri del ricevente prima del trapianto.

La scelta del metodo da utilizzare dipende da diversi fattori che comprendono il tipo di trapianto, l'età e il sesso del ricevente, la malattia di base, nei trapianti di rene il tempo di dialisi, l'età e il sesso del donatore, il tipo di donatore (cadavere o vivente), il numero di precedenti trapianti e in particolare la filosofia adottata dal team trapiantologico relativamente alla gestione del ricevente. Il trapianto di organi solidi e il

trapianto di midollo osseo sono fondamentalmente differenti con vedute immunologiche contrapposte dello stato del paziente e dell'organo del donatore. Il chirurgo che effettua il trapianto di organi solidi si deve preoccupare del rigetto e del fallimento del trapianto a causa della presenza o della formazione nel ricevente di anticorpi anti-HLA mentre il clinico che trapianta il midollo osseo si deve preoccupare della risposta immunitaria del trapianto verso l'ospite (il ricevente) come dimostrato dagli attacchi sferrati dalle cellule T del donatore nella malattia del trapianto contro l'ospite (Graft versus Host Disease, GVHD) (Barocchi et al, 1996; Gebel and Lebeck, 1991; Nademanee et al, 1995; Zhou and Cecka, 1993). Garantire il supporto per entrambi i programmi di trapianto è spesso una sfida difficoltosa per il Laboratorio che esegue i test di istocompatibilità HLA.

Metodiche sierologiche per la rilevazione di anticorpi anti-HLA

Il test sierologico di routine prende il nome di citotossicità-complemento dipendente o CDC (complement dependent cytotoxicity) o ancora test di micro-linfocitotossicità. La tecnica consiste nel mescolare linfociti isolati dal sangue periferico mediante gradiente di densità (Ficoll-Hypaque o Lymphoprep) con dei sieri contenenti anticorpi diretti verso le specificità antigeniche HLA. Dopo un periodo di incubazione, viene aggiunto complemento di coniglio. Il test dopo un periodo di incubazione viene interrotto con l'aggiunta alla miscela di un fissatore cellulare (formalina al 40%) e di un colorante (eosina Y al 3%). Se il colorante viene escluso dalla cellula, il risultato è negativo, se invece si accumula nella cellula il risultato è positivo (anticorpi anti-HLA legati all'antigene espresso sulla superficie cellulare). Gli antigeni HLA o MHC di classe I sono espressi su tutte le cellule nucleate dell'organismo e sono importanti nella tolleranza o nel rigetto dei trapianti; gli antigeni HLA o MHC di classe II sono invece espressi solo da cellule con funzione immunitaria (linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche e linfociti T attivati). La rilevazione di anticorpi anti-HLA preformati di classe I in pazienti trapiantati con organi solidi, è di cruciale importanza. Alla storica tecnica CDC ormai in uso da circa 40 anni, basata sull'uso come cellule bersaglio di cellule linfocitarie vitali, in grado di identificare solo anticorpi fissanti il complemento quali IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgM e caratterizzata da un'alta specificità benché poco sensibile, per implementare quest'ultima alcuni Laboratori hanno affiancato alla reazione antigene-anticorpo (HLA-anti-HLA) una anti human globulin (AHG) (Fig. 3 e 4): l'AHG legandosi ai complessi antigene-anticorpo sulla superficie cellulare linfocitaria ne incrementa il segnale di rilevazione ed è particolarmente efficace nei casi in cui il numero di complessi risulta insufficiente ad attivare il complemento per causa di caratteristiche

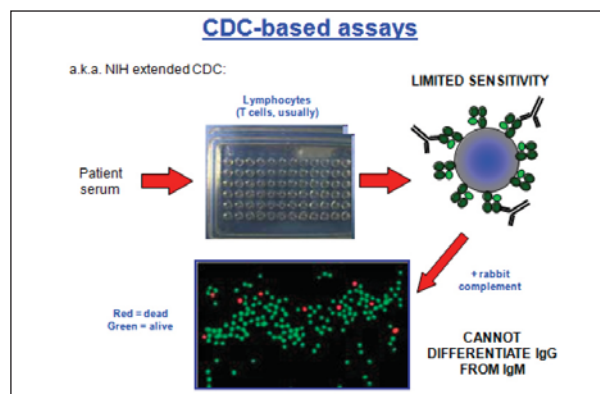


Fig. 3. Il test CDC.

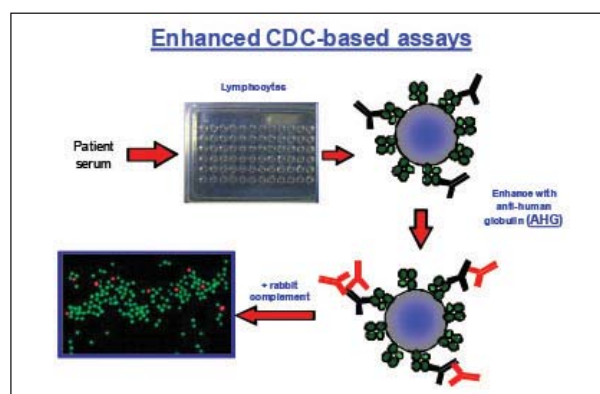


Fig. 4. Il test CDC-AHG.

molecolari intrinseche come l'isotipo dell'anticorpo. Il test CDC trova impiego nella identificazione di antigeni HLA a rischio di malattia (nel caso di associazione HLA e malattie), per la tipizzazione HLA completa delle cellule del paziente e/o del donatore (nel caso di un trapianto); in questo caso viene utilizzato un pannello di antisieri contenenti anticorpi anti-HLA. Per lo screening degli anticorpi anti-HLA o per la loro identificazione nei sieri dei pazienti viene invece utilizzato un pannello di cellule linfocitarie ad HLA noto per la determinazione della presenza di eventuali anticorpi anti-HLA.

Per l'analisi del grado di compatibilità tissutale (test del cross-match) dei linfociti prima del trapianto, vengono cimentate cellule del donatore (donatore di organi) con il siero o con i sieri del paziente ricevente per determinare in via predittiva la reattività citotossica del rigetto iperacuto dell'organo trapiantato. Le cellule del ricevente vengono anche testate contro il loro stesso siero o i loro stessi sieri per determinare la presenza di anticorpi linfocitotossici autoreattivi (auto-crossmatch). La presenza di questi autoanticorpi non viene considerata una controindicazione al trapianto ma possono interferire con l'interpretazione della valutazione della compatibilità donatore-specifico.

In questi ultimi anni si sono aggiunti alla tecnica CDC i cosiddetti solid phase immunoassays. In tali assays vengono utilizzate molecole HLA solubili (di I e di II

classe) purificate da piastrine o da linee cellulari (o ricombinanti) adese in pool (per test di screening) o come singole specificità (per test di identificazione) a piattaforme solide rappresentate da:

- pozzetti di piastre microtiter con sviluppo del test di analisi mediante metodo immunoenzimatico o ELISA;
- microsfere di polistirene (con analisi mediante citometria a flusso standard, per esempio: Flow-PRA (Panel Reactive Antibody));
- microsfere di polistirene impregnate con proporzioni diverse di due coloranti (analisi multiplex con tecnologia Luminex) in modo che ognuna di esse risulti colorata in maniera unica e identificabile con lettura in fluorescenza mediante un doppio laser che permette di classificare e quantizzare le reattività anticorpali rilevate.

Tutti i test che utilizzano piattaforme solide si caratterizzano per l'alta sensibilità rispetto ai test sierologici CDC-AHG, per l'uso in semiautomazione, per efficienza se paragonati al volume di lavoro, permettendo la processazione rapida di un grande numero di campioni. Con la tecnologia Luminex sia lo screening di 96 campioni per anticorpi anti-HLA di classe I e di classe II che la caratterizzazione delle specificità anticorpali per 96 campioni possono essere effettuati per esempio nell'arco di 4 h ciascuno. I solid phase immunoassays consentono inoltre con software dedicati anche valutazioni quantitative che risultano particolarmente utili per valutare l'efficacia nei pazienti altamente immunizzati, di eventuali trattamenti di desensibilizzazione pre-trapianto quali immunoglobuline e.v. ad alte dosi, plasmaferesi e immunoglobuline e.v. a basse dosi e/o infusione di anticorpi monoclonali come anti-CD20. Non solo, l'identificazione degli anticorpi anti-HLA con queste metodologie è diventata particolarmente preziosa specie quando si eseguono ritrapianti con donatori viventi correlati (LRD o living related donor) o non correlati come tra gli sposi (LUD or living related donor) (Santori et al, 2012).

Metodiche di biologia molecolare per la tipizzazione HLA e per la valutazione dell'attecchimento

Il DNA è costituito da un filamento a doppia elica caratterizzato da una sequenza nucleotidica in cui si accoppiano per complementarietà i nucleotidi adenina-timina e guanosina-citosina. I geni consistono in una sequenza nucleotidica localizzata in specifiche e costanti posizioni del genoma. Le sequenze nucleotidiche che vengono trascritte per la sintesi proteica e che prendono il nome di esoni, si alternano a sequenze che non sono invece trascritte (introni). Ad ogni combinazione di tre nucleotidi (codone) corrisponde la sintesi di un aminoacido o di un messaggio necessario per la regolazione del processo di trascrizione. Per sintetizzare una proteina, l'informazione del DNA deve essere trascritta inizialmente in RNA primario che contiene sia

gli esoni che gli introni. Gli introni vengono poi rimossi da un processo conosciuto come RNA splicing che consiste nella escissione degli introni e nella successiva ricongiunzione degli esoni per produrre l'RNA messaggero (mRNA) che viene poi traslato nella proteina a livello degli organelli citoplasmatici. Il codice genetico contiene un certo grado di ridondanza: usualmente differenti codoni che differiscono solo per il terzo nucleotide sono in grado di codificare lo stesso aminoacido. Tuttavia, mutazioni che si incontrano lungo il codice genetico possono dare origine a diverse situazioni. Il cambiamento di un singolo nucleotide o "mutazione puntiforme" può non dare origine a nessun cambiamento dell'aminoacido (mutazione silente) quando il codone mantiene lo stesso messaggio, oppure determinare una vera e propria sostituzione aminoacidica all'interno della struttura proteica. Ulteriori mutazioni puntiformi rappresentate dalla delezione o dall'inserzione di una base nucleotidica determinano uno scorrimento della lettura di tutta la successiva sequenza nucleotidica del gene con conseguente traslazione di una sequenza aminoacidica differente da quella originale e l'introduzione di un codone stop che blocca la produzione completa della proteina. Meno del 35% dei pazienti che necessitano di trapianto di midollo osseo hanno un fratello HLA-compatibile che possa considerarsi un donatore (Barocchi et al, 2007). Una alternativa per questi pazienti è rappresentata da un donatore non correlato. I pazienti che ricevono il midollo da questi donatori vanno incontro ad un rischio di morte da GVHD grave e acuta significativamente più elevato e/o a infezioni. L'analisi retrospettiva a livello allelico di queste coppie di trapiantati dimostrò che questi donatori sierologicamente identici non erano in realtà compatibili a livello molecolare. In aggiunta, la valutazione della compatibilità degli alleli piuttosto che degli antigeni si correlava con una diminuzione dell'incidenza del GVHD e ad un aumento della sopravvivenza dei pazienti. Questa importante osservazione costituì la spinta per la messa a punto di metodologie molecolari di tipizzazione HLA (Halloran, 2004). La tipizzazione molecolare fu applicata per la prima volta agli antigeni HLA di classe II poiché la loro tipizzazione per via sierologica presentava le maggiori difficoltà di realizzazione a causa della difficoltà nella separazione dei linfociti B; di seguito fu introdotta la tipizzazione molecolare anche per gli antigeni HLA di classe I.

Tutte le metodiche che usualmente si adoperano in Laboratorio per la tipizzazione HLA si basano sulla PCR (polymerase chain reaction) (Saiki et al, 1988) ma differiscono tra loro per il grado di risoluzione analitica (risoluzione bassa, intermedia e alta). La tipizzazione a bassa risoluzione identifica gli alleli HLA in misura equivalente alla determinazione degli antigeni HLA con approccio sierologico mentre

la tipizzazione HLA ad alta risoluzione identifica ciascun allele. I metodi con risoluzione intermedia di tipizzazione identificano solamente un numero parziale di alleli. In questi test molecolari la regione bersaglio per l'amplificazione e l'analisi sono gli esoni 2, 3 e 4 della catena α per la classe I e l'esone 2 delle catene α e β per la classe II. In relazione al tipo di trapianto e alla risoluzione richiesta, si possono realizzare uno o più di questi test. L'approccio diagnostico in biologia molecolare ha visto il suo maggiore sviluppo nell'ultimo decennio proprio grazie all'introduzione della PCR: questa tecnica permette di amplificare in modo selettivo miliardi di copie di una piccola regione genomica delimitata da due sequenze nucleotidiche conosciute e specifiche. Il principio sul quale si basa la PCR è quello di denaturare il DNA e di allineare ai singoli filamenti due oligonucleotidi sintetici di circa 20-30 basi che agiscono da primer per una serie di reazioni di sintesi del DNA catalizzate da una polimerasi. I primers sono sintetizzati in modo tale che l'estremità 5' resti all'esterno della porzione di DNA da amplificare mentre l'estremo 3' funga da innesco dei nucleotidi per la sintesi di un filamento complementare a quello originario. Questo processo è amplificato fino a 10^8 volte dal fatto che i prodotti della prima reazione agiscono da stampo per la sintesi di nuovi filamenti. L'amplificato ottenuto da questo processo viene controllato su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio e in seconda istanza studiato con metodiche che presentano principi diversi, ma che sono in grado di verificare se ibridizza con particolari oligonucleotidi, se contiene il sito per uno specifico enzima di restrizione (PCR-RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism) oppure se la sua sequenza nucleotidica differisce da quella di consensus.

Per la tipizzazione HLA i metodi più utilizzati sono la PCR-SSO (Sequence-Specific Oligonucleotides) (Klara and Meral, 2007), la PCR-SSP (Sequence Specific Primers) (Olerup and Zetterquist, 1992), la PCR SBT (Sequence-Based Typing).

La PCR-SSO (Fig. 5) utilizza una amplificazione generica di uno o più esoni che vengono analizzati con

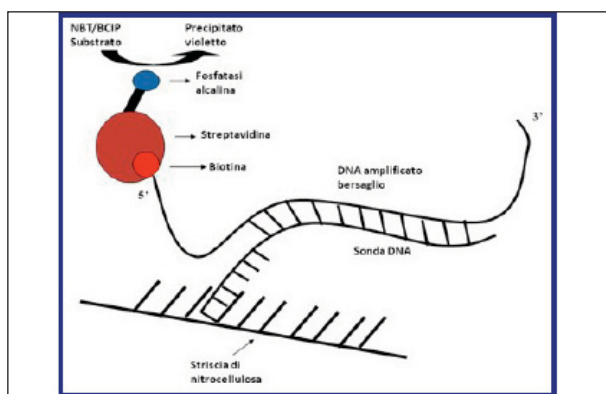


Fig. 5. La tecnica PCR-SSO reverse.

un certo numero di oligonucleotidi, ognuno dei quali riconosce una specifica sequenza nucleotidica. Gli oligonucleotidi marcati per esempio con una molecola di digossigenina, riconoscono sequenze nucleotidiche complementari, si legano in modo specifico all'amplificato complementare e vengono rivelati mediante un complesso costituito da un anticorpo anti-digossigenina marcato con fosfatasi alcalina. La successiva reazione della fosfatasi alcalina con il proprio substrato permette di evidenziare le sonde positive.

La PCR-SSP prevede invece l'impiego di una serie di mix di primers che amplificano in modo specifico un allele o un preciso gruppo di alleli. L'avvenuta reazione di PCR di una o più mix di primers testimonia la presenza di un allele o di un gruppo di alleli e può essere rivelata immediatamente su un gel di agarosio colorato con bromuro di etidio.

Una delle metodologie che ha permesso di aprire nuovi orizzonti negli studi di biologia molecolare è la reazione di sequenza.

Il metodo messo a punto da Sanger (Sanger and Coulson, 1975; Sanger et al, 1977) si basa sul fatto che il sequenziamento di un frammento di DNA parte da un primer e si blocca nel punto in cui un nucleotide opportunamente modificato ddNTP (dideossi-ribonucleotide trifosfato) va ad occupare sulla catena complementare la posizione del suo omologo normale ddNTP (deossi-ribonucleotide trifosfato). La lunghezza dei frammenti di DNA dipende dall'ultima base della sequenza. L'insieme di tali frammenti può essere generato attraverso una interruzione controllata della replicazione enzimatica. Si preparano quattro mix, costituite ciascuna dal campione di DNA che si vuole sequenziare a singolo filamento, dalla DNA polimerasi, da un primer (20 bp) marcato con estremità 3'OH libera (le DNA polimerasi sintetizzano infatti nella direzione 5'→3' e i nucleotidi vengono aggiunti all'estremità 3'OH del nucleotide precedentemente inserito), dai quattro tipi di deossiribonucleotidi trifosfato normali (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) marcati con ^{32}P o ^{35}S o fluorocromo. Per ridurre la compressione delle bande durante l'elettroforesi, dovuta alla formazione di strutture secondarie del DNA, frequente soprattutto per sequenze ricche di G e C, si possono usare miscele di 7-deaza-dGTP o di dITP, invece che dGTP; a ciascuna mix si aggiunge poi uno specifico tipo di 2'-3'-dideossinucleotidi trifosfato (ddNTP): in una provetta ddA, in un'altra ddG, in un'altra ddC ed in un'altra ddT. La DNA polimerasi aggiunge all'estremità libera del primer i nucleotidi complementari al filamento stampo, cioè i dNTP; invece di aggiungere un dNTP, di tanto in tanto, può accadere che aggiunga un ddNTP. Con l'incorporazione del ddNTP la sintesi del filamento complementare si ferma poiché i ddNTP non permettono la formazione del legame con il successivo nucleotide trifosfato. I dNTP hanno nel C3 del deossiribosio un OH che consente l'ag-

giunta di nucleotidi; i ddNTP non presentano il gruppo OH sul C3' ribosio (Fig. 6), quindi una volta inseriti sul filamento nascente bloccano la reazione della polimerasi.

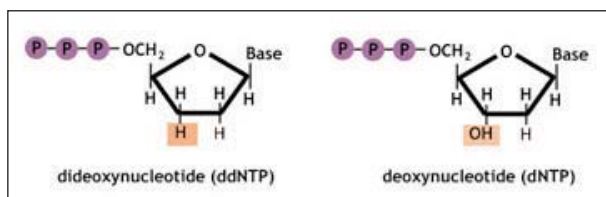


Fig. 6. I dNTP hanno nel C3 del deossiribosio un OH che consente l'aggiunta di nucleotidi; i ddNTP non presentano il gruppo OH sul C3' ribosio, quindi una volta inseriti sul filamento nascente bloccano la reazione della polimerasi.

Si ottengono in questo modo frammenti di DNA di varia lunghezza, che differiscono da provetta a provetta per il tipo di ddNTP con il quale terminano. I campioni marcati contenuti nelle quattro mix vengono poi denaturati al calore e caricati in quattro pozzi diversi, in un gel di poliacrilammide. L'elettroforesi viene realizzata a circa 70°C in presenza di urea in modo da impedire la rinaturazione del DNA. Con l'elettroforesi i frammenti migrano in base alla dimensione; a corsa ultimata, il gel viene messo a contatto con una pellicola radiografica sulla quale lascia impressa la disposizione delle bande: l'immagine ottenuta (autoradiografia) darà la sequenza delle basi (Fig. 7).

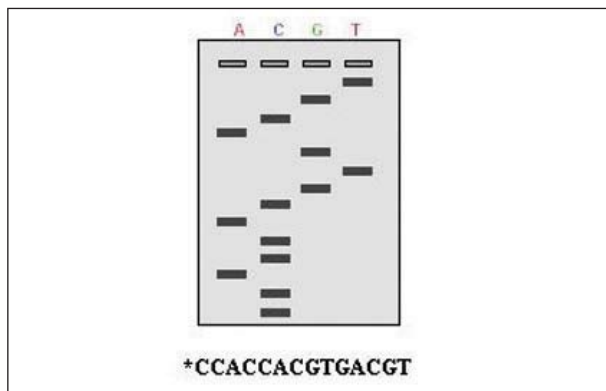


Fig. 7. La sequenza viene letta dal basso del gel verso l'alto. Nella prima corsia elettroforetica (A), si osservano 3 bande, questo significa che in quelle posizioni è stato incorporato un ddATP e quindi significa che in quelle 3 posizioni c'è una A nella sequenza. Si procede con lo stesso ragionamento per le altre 3 corsie elettroforetiche che sono indici di dove sono posizionati i nucleotidi C, T, G. In basso è riportata la sequenza del filamento.

La sequenza viene letta dal basso del gel verso l'alto. Nella prima corsia elettroforetica (A), si osservano 3 bande, questo significa che in quelle posizioni è stato incorporato un ddATP e quindi significa che in quelle 3 posizioni c'è una A nella sequenza. Si procede con lo stesso ragionamento per le altre 3 corsie elettroforetiche che sono indici di dove sono posizionati

i nucleotidi C, T, G. In basso è riportata la sequenza del filamento.

L'introduzione della marcatura fluorescente ha consentito il passaggio dal sequenziamento manuale a quello automatico che prevede sempre una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide (4-8%), su supporto a lastra (slab) o a capillare. Il gel di sequenza sono in genere slab gel molto sottili (spessore da 20 micron a 1 mm), che producono una elevata resistenza elettrica e sono sottoposti a voltaggi-ampere elevatissimi che producono molto calore. Per assicurare il trasferimento di calore e garantire l'uniformità della migrazione, evitando il cosiddetto effetto "smile" in cui i campioni caricati nella parte centrale del gel migrano più velocemente di quelli caricati ai lati, si usano di solito delle piastre di alluminio. Nell'elettroforesi capillare si adoperano microcapillari in silice fusa, con diametro interno compreso fra 10 e 100 micron lunghi 30-50 cm, riempiti da una sostanza che funge da setaccio molecolare (matrice di poliacrilammide, dimetilacrilammide o altri polimeri lineari come polietilenossido o idrossietilcellulosa). Essendo il capillare più sottile rispetto al gel, si verifica una dissipazione più efficiente e si possono usare voltaggi più alti. Il risultato finale è che il tempo necessario per la corsa di riduce fino a 14 volte. È stato pure osservata una riduzione del numero di compressioni (anomalie dovute a strutture secondarie accidentali). Il caricamento è elettrocinetico: il campione viene aspirato dalla provettina che lo contiene e portato velocemente dentro la matrice. L'efficienza di caricamento permette di utilizzare minori quantità di campione. Sono stati sviluppati sequenziatori automatici che possono far correre in parallelo 16, 96, o 384 capillari. La risoluzione può superare i 1000 nucleotidi (Morozova and Marra, 2008; Sinville and Soper, 2007). Sono disponibili in commercio sequenziatori automatici basati sulla fluorescenza, che operano con la modalità 1 colorante/4 corsie (one-dye/four lanes approach), analoga al tradizionale sequenziamento radioattivo con la tecnica di Sanger (corsia elettroforetica separata per ogni reazione di estensione); il composto fluorescente è legato al ddNTP (Cy5-ddNTP marcati con indodicarbocianina) o al primer (la marcatura dei primer utilizzati per il sequenziamento consiste nell'aggiunta di una coda (tag) rappresentata da un colorante fluorescente Texas Red). Altri sequenziatori prevedono invece 4 marcature diverse (quindi 4 lunghezze d'onda) per ciascun ddNTP (4 coloranti/1 corsia) ("big-dyes terminator", che consistono di dideoxinucleotidi marcati con molecole con sistema di trasferimento di energia da un donatore a un accettore). La tecnologia del sequenziamento automatico prevede la rivelazione di frammenti di DNA marcati in modo fluorescente man mano si spostano lungo il gel elettroforetico che è irradiato da un laser. La luce di un laser fisso eccita il marker e dei fotodiodi posti dietro al gel captano l'emissione della fluorescenza; vengo-

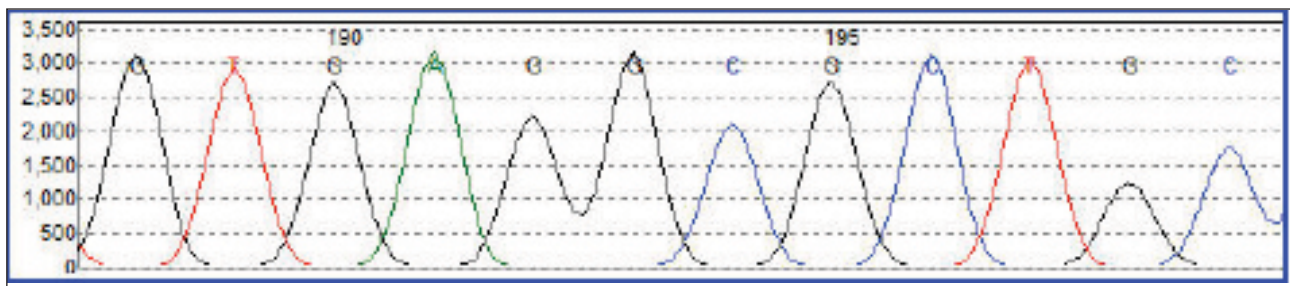


Fig. 8. Elettroferogramma: traccia di una porzione di sequenza di DNA.
T=Timina, A=Adenina, G=Guanina, C=Citosina.

no quindi generati dei segnali. Il segnale risultante produce un pattern di bande che correla con la sequenza di DNA; la trasmissione dei dati a un software di analisi permette di ordinarli e di interpretare la sequenza nucleotidica del template sotto forma di un tracciato che prende il nome di elettroferogramma (Fig. 8).

Oltre alla tipizzazione molecolare HLA del donatore e del ricevente viene realizzato un monitoraggio post-trapianto di midollo osseo per la valutazione dell'attecchimento del trapianto attraverso l'analisi genetica dei loci (microsatelliti) che hanno unità caratteristiche di VNTR (variable-number-tandem-repeat) oppure STR (short-tandem-repeat). Il numero di unità ripetute presenti negli alleli di questi loci è unico per ogni individuo ed è ereditato secondo le leggi mendeliane. I primer della PCR sono disegnati per appaiarsi alle aree che stanno a fianco a queste regioni ripetute. Il risultato di amplificazione che ne deriva varierà nella dimensione in relazione al numero di ripetizioni presenti. Il numero di nucleotidi che costituisce una ripetizione è caratteristico del marcatore del gene microsatellite. Alcuni loci hanno da 2 a 3 nucleotidi nell'unità ripetuta (STRs) mentre altri possono avere da 15 a 70 nucleotidi (VNTRs). L'analisi post-trapianto del sangue periferico o midollare con il marcatore del gene informativo permette una valutazione rapida dello stato del trapianto: la presenza dopo il trapianto di cellule del paziente indica o l'insuccesso della totale rimozione delle cellule del ricevente con la terapia pre-trapianto oppure una probabile recidiva della malattia.

Identificazione di anticorpi anti-HLA nei trapianti di organi solidi e di midollo osseo

È ben noto come la presenza di anticorpi preformati anti-HLA (classe I e classe II) in pazienti in attesa di trapianto, con particolare riferimento al trapianto renale, abbia una influenza negativa sull'outcome del trapianto, essendo responsabile di una aumentata incidenza sia di rigetti acuti anticorpo-mediati talvolta difficilmente controllabili dalla terapia immunosoppressiva, che di rigetti cronici. Tali anticorpi possono:

- non essere più rilevabili nel siero di pazienti dopo un'iniziale picco indotto da eventi immunizzanti quali trasfusioni, gravidanze e precedenti trapianti

non riusciti, pur conservandosi naturalmente una vigorosa presenza di cellule B memoria specifiche in grado di riportare ad alti livelli tali anticorpi in caso di un nuovo boost antigenico, come nel caso di un trapianto esprimente le stesse specificità HLA;

- persistere in circolo a titoli elevati per molti anni anche in assenza di ulteriori stimoli antigenici, rendendo estremamente difficile in tale categoria di pazienti la possibilità di un trapianto, a causa di cross-matches positivi. Numerosi studi hanno mostrato che quasi tutti i pazienti che abbiano perso un trapianto di rene per rigetto acuto e/o cronico e che siano in attesa di un trapianto successivo presentano nel loro siero anticorpi anti-HLA specifici per gli antigeni HLA non condivisi con il rispettivo donatore e spesso anche verso antigeni cross-reattivi con i primi. In aggiunta, la comparsa nel post-trapianto in pazienti non immunizzati di anticorpi anti-HLA "de novo" è stata anch'essa identificata come un importante fattore di rischio per lo sviluppo sia di rigetti acuti che di rigetti cronici.

Gli anticorpi specifici per gli antigeni HLA sia di classe I che di classe II possono essere classificati nelle seguenti tre categorie in base alla loro specificità per epitopi antigenici (Barocchi et al, 2007):

anticorpi diretti verso epitopi "privati" con reattività verso una o più singole specificità antigeniche;
anticorpi diretti verso epitopi "pubblici" con reattività verso alcuni o tutti gli antigeni appartenenti allo stesso cluster di antigeni CREG o cross-reactive groups;

anticorpi "multispecifici" con ampia reattività verso più gruppi CREG ed esprimenti un PRA verso antigeni HLA di classe I e/o II del 90%- 100%.

Da quanto esposto, appare cruciale l'effettuazione di una accurata analisi degli anticorpi anti-HLA sia nei pazienti in attesa di trapianto che nel follow-up di pazienti trapiantati ai fini di:

- migliorare: nei primi, quando immunizzati, le chances di un trapianto seguito da successo;
- prevenire e ritardare nei secondi l'incidenza di rigetti acuti e cronici, modificando le strategie di immunosoppressione nel caso di una loro precoce comparsa.

Negli ultimi anni le tecniche di screening della presenza di anticorpi anti-HLA e di identificazione delle

loro specificità si sono notevolmente evolute e raffinate permettendone una precisa determinazione e caratterizzazione anche quando presenti a basso titolo o appartenenti a classi e sottoclassi anticorpali non fissanti il complemento quali IgA e IgG4 che sono comunque capaci di procurare danno su cellule parenchimali dell'organo trapiantato attraverso la ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity), mediata in maniera aspecifica da monociti/macrofagi e cellule NK. Tali nuove possibilità diagnostiche di screening e identificazione anticorpale hanno avuto importanti ricadute sul piano clinico consentendo di trapiantare con successo un numero sempre più grande di pazienti ad alto rischio perché immunizzati.

Per quanto riguarda il trapianto di midollo osseo, diversamente da quanto accade nel trapianto di organi solidi, il trapianto deve essere preceduto dalla distruzione del sistema immunitario del paziente attraverso l'uso della chemioterapia e/o della radioterapia. Questi pazienti generalmente non necessitano del monitoraggio anticorpale poiché la memoria antecedente della sensibilizzazione antigenica è resa non funzionale o distrutta. D'altra parte, in diversi laboratori si effettua sui riceventi uno screening anticorpale prima del trapianto in quanto la presenza di questi anticorpi è in grado di distruggere le cellule del midollo trasfuso dal donatore con conseguente diminuzione della massa cellulare trasfusa, ritardo dell'attecchimento e rischio di infezioni batteriche, virali e fungine. Il rigetto del trapianto di midollo osseo è raro ed è dovuto alla presenza di cellule residue del paziente presenti a causa di inadeguata terapia immunosoppressiva e preparazione pre-trapianto.

Differenti tipi di trapianto di midollo osseo necessitano di diversi livelli di tipizzazione HLA.

I trapianti autologhi hanno bisogno della sola tipizzazione molecolare di classe I (HLA-A,B e C) a bassa risoluzione (2 digit) per il supporto delle piastrine. I trapianti allogenici tra parenti (fratelli donatori) necessitano della tipizzazione HLA molecolare di classe I (HLA-A,B e C) e di classe II (HLA-DRB1* e DQB1*) ad alta risoluzione (4 digit) così come i trapianti allogenici tra non parenti. Per questi ultimi due casi la tipizzazione HLA molecolare può essere estesa anche ai loci DRB3*/B4*/B5*, DQA1*, DPA1* e DPB1*.

Utilizzo di farmaci immunosoppressori nella terapia antirigetto

L'immunosoppressione è un trattamento medico-farmacologico che prevede che il paziente assuma dei farmaci, detti immunosoppressori, capaci di inibire la risposta del sistema immunitario ad antigeni non-self (cioè antigeni estranei all'organismo).

I farmaci immunosoppressori si utilizzano principalmente nei trapianti d'organo, ma anche in altre patologie, ad esempio quelle a eziologia autoimmune.

Il paziente ha ricevuto il trapianto, deve assumere a vita, senza alcuna eccezione, questi farmaci, per evitare che il suo sistema immunitario attacchi l'organo e ne provochi il rigetto. Il successo dei trapianti di organi solidi dipende principalmente dal loro utilizzo appropriato e da una buona conoscenza delle loro caratteristiche farmacocinetiche. Idealmente si dovrebbe riuscire a somministrare una quantità di farmaco capace di garantire un livello adeguato di immunosoppressione per evitare il rischio di rigetto acuto o cronico dell'organo trapiantato limitando al tempo stesso la comparsa di effetti collaterali anche gravi. Un singolo farmaco non è infatti in grado di inibire le allo-risposte proliferative ed il rigetto ed è necessario associare farmaci diversi, volti a inibire le fasi principali delle allo-risposte.

Le attuali terapie tendono ad associare più farmaci nella prima fase: anti-CD 25 (Simulect), un inibitore della calcineurina (CYA o FK 506), un cortisonico (prednisone), un inibitore della mitosi (Aza o MMF); nella fase di mantenimento (dopo 6 mesi/1 anno) si riduce ad un inibitore della calcineurina associato a Sirolimus (Rapamune) o a MMF.

La politerapia ha lo scopo di permettere una graduale diminuzione dei livelli plasmatici dei principali immunosoppressori che sono nefrotossici.

I farmaci immunosoppressivi hanno contribuito in maniera determinante al successo del trapianto e il monitoraggio terapeutico ematico (TDM) è parte integrante del protocollo trapiantologico. Il TDM può essere definito come la misura della concentrazione del farmaco terapeutico nei liquidi biologici così da verificare la sua efficacia e i limiti della sua tossicità e rappresenta quindi uno strumento potente in mano al clinico per ottimizzare e adottare la posologia alle esigenze del singolo paziente. Occorre tuttavia chiedersi se sia giusto aggiustare il dosaggio basandosi solo sul responso clinico e se sia giustificato il TDM sul piano farmaco-economico; la risposta a tali quesiti consiste in un uso razionale del TDM:

- a inizio terapia per individuare un regime terapeutico adeguato;
- quando la finestra terapeutica è stretta;
- quando gli effetti tossici sono particolarmente gravi;
- quando esiste una significativa correlazione tra la concentrazione plasmatica del farmaco ed effetto sugli organi-bersaglio;
- nella politerapia per evidenziare eventuali interazioni tra farmaci (inibizione o induzione enzimatica);
- in pazienti con particolari condizioni fisiologiche (età, gravidanza);
- in pazienti con alterata funzionalità epatica e/o renale;
- quando si sospetta una non corretta aderenza alla terapia (compliance);
- quando si sospettano disfunzioni genetiche;

- in tutte le situazioni in cui ci sia un'alterata risposta allo schema terapeutico proposto.

La valutazione del rapporto costo/beneficio nel controllo del monitoraggio ematico del farmaco è senza dubbio a favore del beneficio in considerazione di potenziali effetti di particolare gravità sia nel caso di livelli di concentrazione tossici che di livelli di concentrazione inefficaci. Nello specifico caso di pazienti trapiantati, una terapia immunosoppressiva inadeguata può essere causa di minore sopravvivenza dell'organo trapiantato per l'effetto nefrotossico che può scatenare la maggior parte dei farmaci immunosoppressori.

L'applicazione degli immunosoppressori ha radicalmente incrementato la sopravvivenza del trapianto (oggi siamo al 90% entro il 1° anno di vita per il trapianto renale). Questo trend è iniziato negli anni '80 con l'introduzione in aggiunta ai corticosteroidi della ciclosporina A (CYA), per poi proseguire con la pratica del suo monitoraggio con una formulazione più biodisponibile (dal Sandimmune al Neoral). In seguito sono stati introdotti altri farmaci più potenti e agenti in sinergia verso la proliferazione dei linfociti T (Tacrolimus, Acido Micofenolico, Sirolimus, ed il più recente Everolimus).

Il successo della terapia immunosoppressiva necessita di un dosaggio il più possibile frequente e con ragionevoli tempi di risposta (metodiche immunometriche con elevata automazione). I linfociti T giocano un ruolo centrale nel rigetto del trapianto; tutte le strategie per prevenire l'attivazione e la proliferazione clonale dei T sono quindi potenzialmente utili per l'immunosoppressione. Il segnale di partenza per l'attivazione dei linfociti T è dato dall'interazione tra gli antigeni del donatore e il recettore specifico (TCR) presente sulla superficie dei linfociti T del ricevente. Su questi, sono presenti proteine di membrana implicate nell'allo-riconoscimento dell'antigene (CD4, CD8, CD2, CD25, CD28), da cui si originano segnali accessori di attivazione e proliferazione. Queste innescano una serie di eventi biochimici (attivazione di tirosin-chinasi, fosfolipasi, mobilitazione di Ca^{2+} intracitoplasmatico) finalizzati all'attivazione di geni responsabili della produzione di citochine e recettori citochinici.

L'attività mitotica è scatenata dal legame di alcune citochine (IL-2 e IL-4) ai rispettivi recettori. In considerazione delle varie fasi di evoluzione della risposta linfocitaria all'allo-trapianto, si possono allestire farmaci in grado di inibire i vari stadi:

- inibire il riconoscimento dell'antigene;
- inibire i generatori del segnale proliferativo;
- inibire l'amplificazione del segnale;
- inibire la trasduzione del segnale;
- inibire la sintesi di DNA.

Tra gli inibitori dei generatori del segnale proliferativo vi sono anticorpi monoclonali anti-CD25 (Simulect), tra gli inibitori della sintesi dell'IL-2, la CYA e l'FK506, tra gli inibitori della trasduzione del segna-

le il Sirolimus e l'Everolimus, tra gli inibitori della sintesi del DNA, l'Azatioprina, l'acido Micofenolico, che esercita una specifica azione di inibizione dell'enzima Inosina-Monofosfato deidrogenasi (IMDH) e l'FTY 720, in grado di bloccare il processo infiammatorio.

Sono qui di seguito riportati alcuni protocolli con indicazioni statistiche del successo terapeutico nella prima fase del trapianto:

- CYA + MMF + steroidi = > 95% di sopravvivenza del rene trapiantato a 6 mesi (Winearls, 1995);
- FK 506 + MMF + steroidi = > 92% (Trapianto di rene) a 6 mesi (Shapiro et al, 1998);
- CYA + Simulect + steroidi = > 93% (Trapianto di rene) a 6 mesi (Vincenti, 1999).

La valutazione di nuovi farmaci immunosoppressori necessita di tempo, richiedendo confronti di sopravvivenza d'organo e valutazioni nel lungo periodo (5-10 anni).

Ciclosporina A (CYA)

È un potente farmaco immunosoppressore scoperto nel 1970 sul terreno di un altopiano norvegese e isolato dal fungo *Tolypocladium inflatum*. Strutturalmente è un polipeptide ciclico contenente 11 aminoacidi, altamente idrofobico, solubile nei lipidi e nei loro solventi (Fig. 9). La sua prima formulazione, Sandimmune, era scarsamente assimilabile; con l'introduzione del Neoral in microemulsione la biodisponibilità è salita al 49%. Questo farmaco, una volta attraversata la membrana cellulare, si lega nel citoplasma alla ciclofillina e alla calmodulina che sono proteine Ca^{2+} -dipendenti (Hemenway et al, 1999).

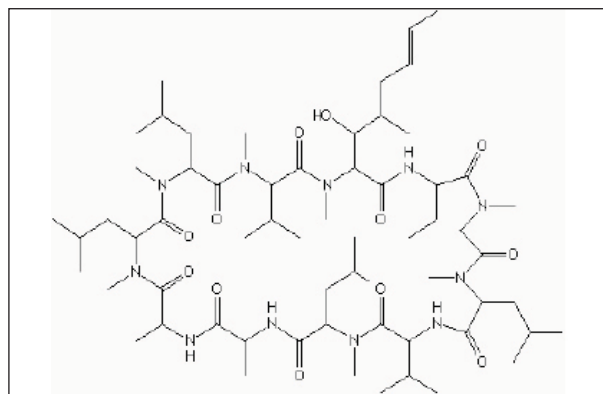


Fig. 9. Struttura chimica della Ciclosporina A (CYA).

Dato che sia la CYA isolata sia le immunofiline da sole non sono farmacologicamente attive, questo farmaco può anche considerarsi un pro-farmaco. Il complesso proteina-recettore raggiunge il nucleo, dove interferisce con l'mRNA responsabile della sintesi di IL-1 e IL-2, inibendo così la produzione di linfociti T citotossici e lasciando quasi inalterati i linfociti T soppressori. La CYA viene assorbita a livello intestinale, il 50% si lega ai globuli rossi, il

30% alle lipoproteine (l'80% alle HDL) e il restante nei leucociti. La sua farmacocinetica prevede un'ampia metabolizzazione ad opera del sistema enzimatico epatico microsomiale (isoenzimi CYP3A4); l'escrezione è biliare.

Concentrazioni inadeguate di CYA possono produrre gravi effetti collaterali (nefrotossicità, intolleranza glucidica, iperlipidemia). Per limitare queste problematiche, nella fase di mantenimento si tende a diminuire progressivamente la dose di CYA associandola altri farmaci immunosoppressori (steroidi o Sirolimus).

Tacrolimus (FK-506)

È stato isolato originariamente da un ceppo di *Streptomyces tsukubaensis* nel 1984. Chimicamente è un lattone macrolide di 24 unità (Fig. 10), con proprietà immunosoppressive simili ma più potenti della CYA. Il suo meccanismo di inibizione prevede legami ai linfociti T (FK binding protein), con inibizione dell'attività fosfatase della calcineurina.

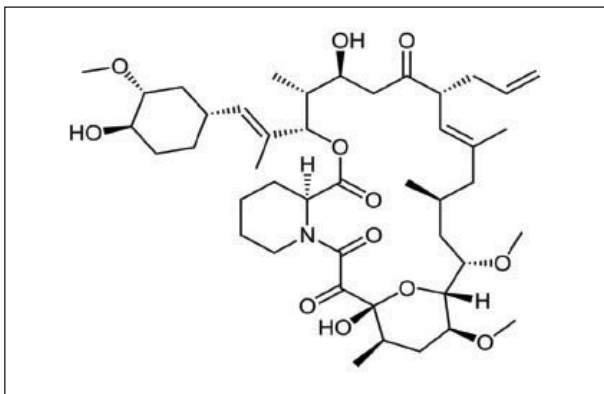


Fig. 10. Struttura chimica del Tacrolimus (FK506).

Il blocco delle vie di trasduzione del segnale Ca^{2+} -dipendente provoca arresto dell'attività proliferativa e della funzionalità dei linfociti T. Il suo assorbimento è influenzato dall'attività della glicoproteina P (P-gp), elevata nelle popolazioni afro-americane, che richiedono dosi maggiori di FK506.

Anche l'uso dell'FK506 è associato ad effetti secondari tossici gravi (nefrotossicità, alterata tolleranza glucidica, ipertensione, insonnia, disturbi gastrointestinali). L'FK506 può essere assunto sia per via ev che per os. L'assorbimento del tratto gastrointestinale avviene in modo variabile ed irregolare. Viene metabolizzato ad opera dell'isoenzima del Cit P450 CYP3A4.

L'FK506 si lega fortemente ai globuli rossi e alle proteine plasmatiche. La correlazione tra la biodisponibilità assoluta e il valore basale è assai alta. Il prelievo su sangue intero con EDTA va eseguito subito prima della somministrazione del farmaco.

Sono almeno 9 i metaboliti di rilievo dell'FK506; di questi M1, M.III e M-V non hanno attività farmacologica, mentre M-II è farmacologicamente attivo.

Sirolimus (Rapamicina)

Scoperto nel 1970 in un campione di terreno proveniente da Rapa Nui (Isola di Pasqua) e per questo motivo chiamato anche Rapamicina è un macrolide antibiotico (Fig. 11) prodotto dallo *Streptomyces hydropiscus*. A differenza degli inibitori della calcineurina (CYA e FK506), ha un effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule T agendo sulla fase ultima dell'attivazione del linfocita T, inibendo IL-2 e IL-4. Si lega alle stesse immunofiline dell'FK506 (FKBP12) ma con differente affinità. Il complesso Sirolimus-FKBP si lega alla proteina detta SER (sirolimus effector protein) e al mTOR (mammalian target of rapamicina) inibendola. È metabolizzato dal CYP3A4 in circa 10 metaboliti idrossilati e demetilati che non sono farmacologicamente attivi. Anche il Sirolimus si distribuisce sui globuli rossi con un rapporto sangue/plasma di 36; il dosaggio si esegue su sangue intero in EDTA. La somministrazione nel periodo post-Tx renale è in associazione alla CYA nei primi tre mesi, e quindi in associazione ai soli corticosteroidi nella fase di mantenimento (McAlister et al, 2002).

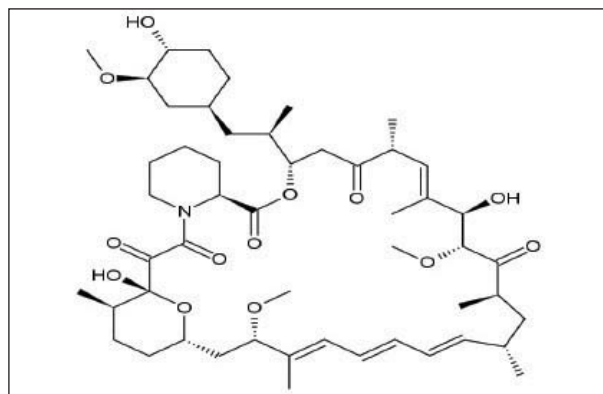


Fig. 11. Struttura chimica del Sirolimus.

Everolimus

È un derivato chimico del Sirolimus (Fig. 12), con migliore biodisponibilità ed una riduzione della vita media. Come il Sirolimus, inibisce la chinasi p70S6 e la chinasi ciclino-dipendente, determinando un arresto del ciclo cellulare tra la fase G1 e S, oltre ad ini-

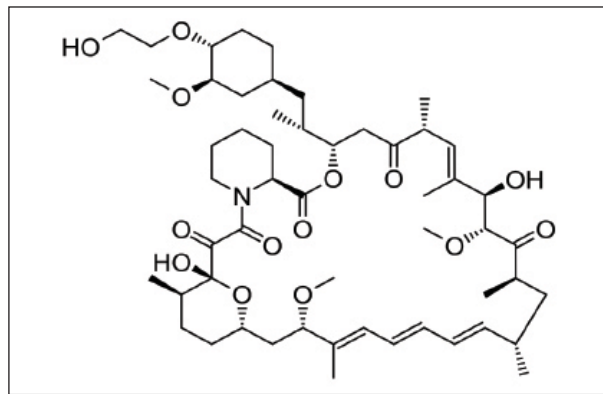


Fig. 12. Struttura chimica dell'Everolimus.

bire la proliferazione delle cellule T, B e altre cellule non emopoietiche mediata da IL-2 e IL-15. Strutturalmente è simile al Sirolimus, ma la sostituzione di un gruppo molecolare rende l'Everolimus più biodisponibile e con un tempo di emivita più breve (30 h). La capacità inibitrice della proliferazione cellulare è leggermente inferiore, ma essendo nella farmacocinetica meno influenzata dalla CYA, questo farmaco è utilizzato insieme all'inibitore della calcineurina. L'Everolimus è determinabile nel sangue intero tramite un metodo immunometrico (Formica et al, 2004; Lutz et al, 2012).

Acido Micofenolico, Micofenolato-Mofetile (MMF)

È un farmaco immunosoppressore usato in associazione con CYA o FK506. In commercio ci sono due formulazioni: l'estere (profarmaco) e l'acido in preparazione gastroprotetta. Il micofenolato-mofetile è l'estere dell'acido micofenolico (Fig. 13). Dopo as-

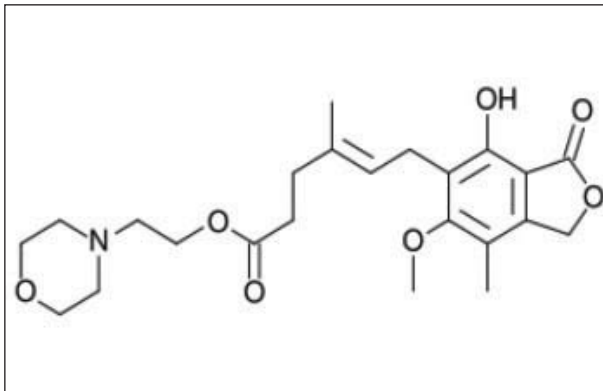


Fig. 13. Struttura chimica del Micofenolato-Mofetile (MMF).

sunzione, per azione di una esterasi, si trasforma nella forma acida (MPA), farmacologicamente attiva. L'MPA è metabolizzato a livello entero-epatico a glucoronide MPAG inattivo. Agisce come inibitore selettivo e reversibile dell'Inosina Monofosfato Deidrogenasi (IMPDH), un enzima che converte l'inosina monofosfato a guanosina monofosfato, inibendo così la sintesi delle purine (adenina e guanina), in particolar modo delle cellule T e B attivate. Essendo più del 99% presente nella frazione plasmatica, la determinazione dell'MMF viene effettuata sul surnatante di campioni di sangue in EDTA. Il farmaco si lega fortemente all'albumina ed essendo solo la frazione libera quella farmacologicamente attiva, risente, nella sua azione farmacologica, di patologie legate ad una carenza proteica (insufficienza renale e/o epatica).

Nei trials effettuati sinora, è stata dimostrata l'indubbia efficacia antirigetto dell'associazione MMF-CYA/FK506. Nonostante ciò non vi sono pareri concordi sull'utilità del monitoraggio plasmatico di questo farmaco a fronte di evidenze quali:

- l'efficacia immunosoppressiva del MMF è fortemente correlata con la sua concentrazione plasmatica;

tici: livelli basali (trough level) <1.5 mg/L sono associati ad inefficacia del farmaco, livelli >10 mg/L ad effetti collaterali/tossici gravi (disturbi gastrointestinali e leucopenia);

- possibili interazioni tra MMF ed altri farmaci;
- alta variabilità individuale nella concentrazione plasmatica;
- difficoltà di gestione nell'età pediatrica.

Nell'ambito della terapia di mantenimento, l'introduzione del MMF in protocolli basati sugli inibitori delle calcineurine consente una riduzione dell'FK506 o la sospensione della CYA, sia in fase precoce che tardiva, senza un significativo incremento del rischio di rigetto acuto e con netto miglioramento della funzione renale (Marcén, 2009). Per questa sua caratteristica, oltre che per la sua capacità di prevenire lo sviluppo e la progressione dell'arteriopatia proliferativa, l'MMF ha assunto anche un ruolo nel trattamento della granulomatosi di Wegener. Inoltre, l'MMF sembrerebbe avere effetti antivirali verso l'HSV e l'EBV e avrebbe anche la capacità di inibire lo sviluppo di *Pneumocystis Carinii*.

Anti-CD25

Gli mAb anti-CD25 sono diretti contro la catena α del recettore per IL-2 (CD25 o TAC), la cui espressione è aumentata solo nei linfociti T attivati. La selettività di questi farmaci, la lunga emivita, la mancanza di immunogenicità, la minima tossicità acuta, la possibilità di uso ricorrente e di somministrazione intermittente hanno contribuito alla loro diffusione grazie alla loro maggiore flessibilità nella fase di mantenimento. In particolare, l'induzione con Basiliximab o Daclizumab ha consentito di adottare protocolli in grado di minimizzare l'uso degli steroidi e/o dell'inibitore delle calcineurine, con tassi di rigetto acuto ad 1 anno che si collocano intorno al 15%-25% (Manzoor, 2008).

Azatioprina

Questo agente (Fig. 14) inibisce la divisione e l'attivazione dei linfociti T e la proliferazione dei promielociti nel midollo osseo, interferendo con la sintesi del DNA e dell'mRNA.

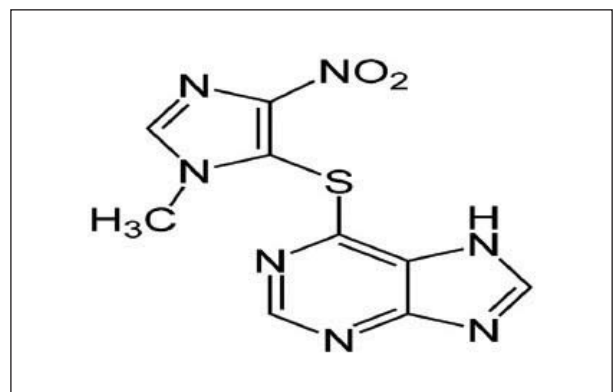


Fig. 14. Struttura chimica dell'Azatioprina.

Solitamente l'azatioprina si usa in associazione alla ciclosporina ed è necessario ridurre il dosaggio in caso di leucopenia, un effetto collaterale dovuto all'inibizione esercitata sul midollo osseo.

Attualmente viene spesso usato, in sostituzione all'azatioprina, l'MMF che ha un meccanismo d'azione analogo.

Glucocorticoidi

Rappresentano i farmaci immunosoppressori di elezione e possono essere utilizzati sia nella fase di induzione della terapia che in quella di mantenimento. Somministrati per ev (metilprednisolone) (Fig. 15) o per os (prednisolone, prednisone) (Fig. 16) e in dosi elevate inducono un effetto linfocitotossico mentre a dosi più basse agiscono come immunosoppressori e antiinfiammatori, limitando la produzione di citochine. Quindi, la dose e la durata del trattamento devono essere stabilite in funzione della patologia. I glucocorticoidi oltre ad impedire la migrazione dei monociti, esercitano un ulteriore blocco sulla produzione di IL-2. Tra questi, il più efficace è il prednisone: somministrato prima o al momento del trapianto; il suo dosaggio viene poi ridotto per evitare la predisposizione alle infezioni e il ritardo nella guarigione delle ferite, nonché altri importanti effetti collaterali, quali ipertensione, dislipidemia, intolleranza al glucosio, osteoporosi, gastrite e ulcera peptica. I glucocorticoidi sono utilizzati, oltre che per la profilassi del rigetto, anche per il trattamento del rigetto acuto.

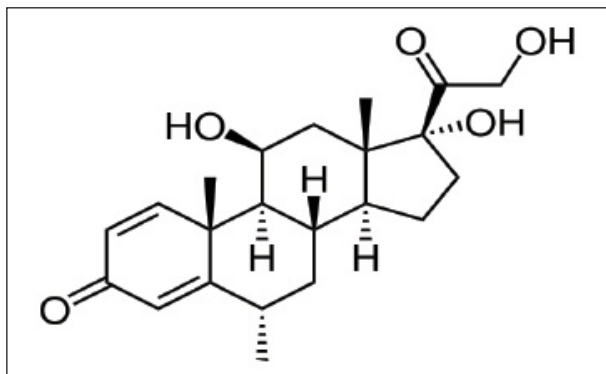


Fig. 15. Struttura chimica del metilprednisolone.

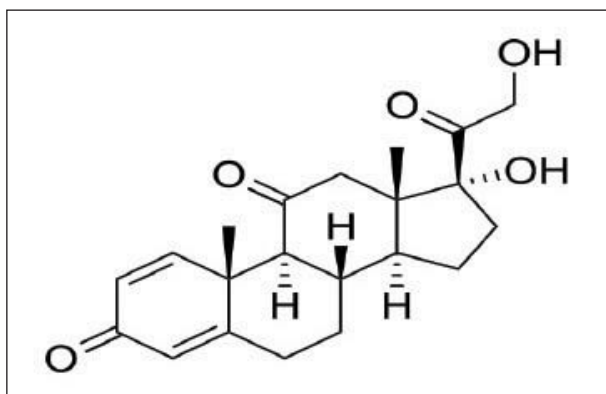


Fig. 16. Struttura chimica del prednisone.

Bibliografia

- Barocci S, Valente U, Gusmano R et al. HLA matching in pediatric recipients of a first kidney graft. A single center analysis. *Transplantation* 1996; 61(1):151-154.
- 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.
- Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993; 14(7): 349-352
- Formica RN, Lorberb KM, Friedmanb AL, Bial MJ, Lakkisa F, Smitha JD, Lorber MI. The evolving experience using everolimus in clinical transplantation. *Elsevier* 2004; 36 (2): 495-499.
- Gebel HM, Lebeck LK. Crossmatch procedures used in organ transplantation. *Clin Lab Med* 1991; 11(3): 603-620.
- Jackson MR, Peterson PA. Approaching an understanding of MHC class I antigen presentation in Humphrey RE, Pierce SK (eds) *Antigen Processing and Presentation*. New York, Academic Press, 1994, 1-15.
- Janeway CA, Travers P. *Immunobiology. Second Edition* New York, Garland Publishing 1996.
- Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715-2729.
- Hemenway CS, Heitman J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys* 1999; 30(1): 115-151.
- Klara D, Meral B. HLA Typing with Sequence-Specific Oligonucleotide Primed PCR (PCR-SSO) and Use of the Luminex™ Technology. *Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. Methods in Mol Med* 2007; 134: 61-69.
- Lee J. HLA system. A new approach. New York, Springer-Verlag 1990.
- Lutz M, Kapp M, Grigoleit GU, Stuhler G, Einsele H, Mielke S Salvage therapy with everolimus improves quality of life in patients with refractory chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 410-411.
- Nademanee A, Schmidt GM, Parker P et al. The outcome of matched unrelated donor bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies using molecular typing for donor selection and graft-versus host disease prophylaxis regimen of cyclosporine, methotrexate and prednisone. *Blood* 1995; 86 (3): 1228-234.
- Madden DR. The three dimensional structure of peptide MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 587-622.
- McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, MacDonald AS. A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit* 2002; 24 (3): 346-350.

Manzoor MK, Immunopharmacology, Springer, 2008, 87-126.

Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 2009; 12: 2227-2243.

Morozova O and Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008; 92: 255-264.

Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-335.

Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239 (4839): 487-491.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94 (3): 441-448.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74 (12): 5463-5467.

Santori G, Barocci S, Fontana I, et al. Kidney transplantation from living donors genetically

related or unrelated to the recipients: a single-center analysis. *Transplant Proc* 2012; 44 (7):1892-1896.

Shapiro R, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas C, Gritsch HA, McCauley J, McQuitty D, Randhawa P, Irish W, McMichael J, Hakala TR, Simmons RL, Fung JJ, Starzl TE. Outcome after steroid withdrawal in renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplant Proc* 1998; 30 (4):1375-1377.

Sinville R and Soper S. A. High resolution DNA separations using microchip electrophoresis. *J Sep Sci* 2007; 30: 1714-1728.

Vincenti F. Potential of daclizumab in solid organ transplantation. *BioDrugs* 1999 May;11(5):333-341.

Winearls CG. Mycophenolate mofetil for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 346:253-254.

Zhou YC, Cecka JM. Effect of HLA matching in renal transplant survival, in Terasaki P. Cecka JM (eds). *Clinical Transplants*. Los Angeles, *UCLA Tissue Typing Laboratory* 1993, 495-510.

Address correspondence to:

Prof. Sergio Barocci

Via A. Robino 87/8,

16142 Genova

e-mail: sergiobarocci@gmail.com

Pervenuto il 28/12/2013

L'IMPORTANZA DEI POLIMORFISMI HLA E NON-HLA NEL TRAPIANTO RENALE

¹SERGIO BAROCCI, ²ATTILIO FABIO CRISTALLO

¹UNI.T.E. Università degli studi di Genova - Area della Facoltà di Medicina e di Scienze M. F. N.

²Servizio di Immunoematologia e Trasfusione, Ospedale Santa Chiara, Trento

Riassunto

Nonostante i progressi compiuti nel campo della terapia immunosoppressiva, il rigetto rimane ancora una delle principali cause di morbidità e mortalità dei pazienti dopo trapianto di organi solidi. Le cause genetiche in grado di influenzare l'esito di un trapianto renale sono molteplici. Uno dei fattori principali che può determinare il successo del trapianto renale è rappresentato dalla compatibilità degli antigeni HLA tra la coppia donatore/ricevente, in particolare per i loci HLA-A, HLA-B e HLA-DR. La compatibilità HLA rimane una barriera immunologica fondamentale, nonostante l'introduzione di moderni trattamenti immunosoppressivi. Vi sono anche prove che l'alloreattività delle cellule natural killer (NK) possa contribuire al buon esito del trapianto renale. Tuttavia, l'impatto clinico tra le combinazioni dei prodotti dei geni KIR (famiglia dei recettori delle cellule NK) e dei loro ligandi HLA nella coppia donatore / ricevente è ancora da chiarire. In aggiunta, anche altre molecole come le citochine possono essere coinvolte nella reazione immunitaria contro il trapianto renale ma le implicazioni inerenti legate al loro polimorfismo genetico sono ancora da definire. Quindi, essendo tuttora la compatibilità HLA una componente imprescindibile per ogni trapianto di rene, è abbastanza prematuro utilizzare gli altri due fattori immunogenetici sia per l'assegnazione degli organi da trapianto sia come fattori prognostici.

Parole chiave: HLA, MHC, cellule natural killer, recettori KIR, citochine, polimorfismo, trapianto di rene.

Summary

Despite the progress made in the field of immunosuppressive therapy, rejection remains a major cause of morbidity and mortality of patients after solid organ transplantation. There are many genetic causes that can influence the outcome of a renal transplant. One of the main factors that can determine the success of renal transplantation is the compatibility of HLA antigens between the pair donor/recipient, in particular for the loci HLA-A, HLA-B and HLA-DR. HLA matching remains a fundamental immunological barrier, despite the introduction of modern immunosuppressive treatments. There is also evidence that the alloreactivity of natural killer cells (NK) cells may contribute to the successful outcome of renal transplantation. However, the clinical impact between the combinations of the products of KIR genes (family receptors of NK cells) and their HLA ligands in the pair donor/recipient is yet to be clarified. In addition, also other molecules such as cytokines may be involved in the immune reaction against the renal transplant but the implications related to their inherent genetic polymorphism is yet to be defined. So, being still HLA matching an indispensable component for each kidney transplant, it is quite premature to use the other two factors is immunogenic for the allocation of organs for transplantation and as prognostic factors.

Introduzione

Il trapianto di organi solidi tra due individui geneti-

camente non correlati induce una forte risposta immunitaria nel ricevente che ha come esito il rigetto del trapianto. Questa reazione immunologica è largamente determinata da fattori genetici. Le strategie in grado di inibire questa reazione comprendono una ottimale compatibilità genetica tra la coppia donatore e ricevente e l'uso della terapia immunosoppressiva allo scopo di prevenire la reazione di rigetto. Oltre al classico sistema HLA umano, altri fattori immunogenetici sono emersi in questi ultimi anni per il loro notevole interesse immunologico nel campo dei trapianti di organi solidi. La presente rassegna vuole focalizzarsi sulle attuali conoscenze del significato della compatibilità HLA ma anche dei recettori KIR delle cellule NK e dei polimorfismi genetici di diverse citochine come IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β .

Il polimorfismo HLA

I geni HLA sono situati sul braccio corto del cromosoma 6 e codificano per tre loci HLA di classe I (HLA-A,-B,-C) e per i tre loci HLA di classe II (HLA-DR,-DQ,-DP) (Fig. 1A). I geni HLA costituiscono un sistema multigenico con un alto polimorfismo allelico nelle popolazioni umane; attualmente si conoscono 6919 alleli di classe I e 1875 alleli di classe II (Fig. 1B). Se si prende per esempio in considerazione la sottoregione DR di classe II, anche in questa esiste un certo livello di complessità, considerando che oltre al gene che tutti hanno per gli alleli DRB1 (DR1-DR18 sierotipi), il 90% circa degli individui possiede un secondo gene DRB (DRB3, DRB4 o DRB5). Questo secondo locus DRB codifica per sierotipi molto

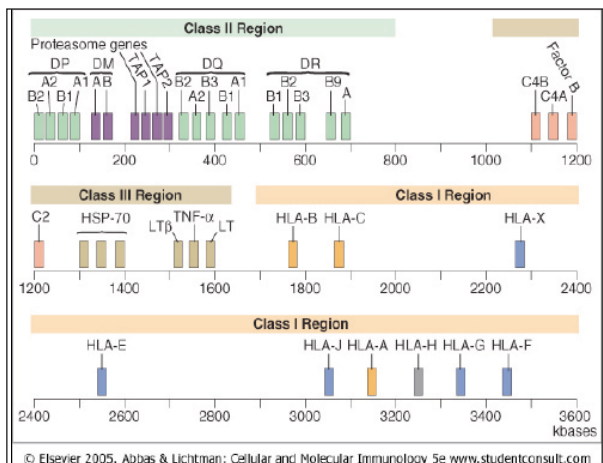


Fig. 1A. Mappa dei geni MHC sul braccio corto del cromosoma 6. Questi geni codificano proteine polimorfiche coinvolte nella presentazione antigenica alle cellule T.

meno polimorfi, rispettivamente DR52, DR53 e DR51.

Poiché i geni HLA sono co-espressi prevalentemente come glicoproteine di superficie cellulare, un individuo eterozigote è in grado di esprimere sino a 14 differenti antigeni HLA.

La funzione biologica delle molecole HLA è quella di presentare antigeni peptidici ai linfociti T: la diversità HLA è importante nelle popolazioni umane poiché il polimorfismo HLA dà luogo al riconoscimento e alla presentazione di un antigene peptidico più ampio alle cellule T, permettendo così una risposta immunitaria acquisita ottimale. Il polimorfismo HLA rappresenta quindi un'importante barriera immuno-

logica nel trapianto di organi solidi, e il rischio di rigetto acuto/cronico dovuto a incompatibilità HLA è sempre presente: il numero di incompatibilità HLA aumenta il rischio di un fallimento del trapianto (Aydingoz et al, 2007, Clark B et al, 2010, Wissing et al, 2008).

A causa dell'elevato polimorfismo allelico, le molecole HLA sono dei potenti induttori della risposta immunitaria e gli anticorpi anti-HLA possono comparire dopo esposizione ad alloantigeni HLA, in genere in seguito a trasfusione di sangue, gravidanze multiple e a trapianti precedenti (Halloran, 2003).

Lo sviluppo "de novo" di questi anticorpi anti-HLA rappresenta un fattore di rischio per il rigetto del trapianto così come la presenza di anticorpi anti-HLA preformati rappresenta una barriera al successo del trapianto (Barocci et al, 2007, Lefaucheur et al, 2009).

I progressi ottenuti con la terapia immunosoppressiva hanno consentito di gestire in maniera più efficiente gli episodi di rigetto, nonostante i problemi derivanti dalla compatibilità HLA (Wujciak et al, 1999). Da uno studio basato sui dati UNOS è emerso che l'impatto della compatibilità HLA risulta notevolmente diminuito (Su et al, 2004): la conseguenza è stata che diversi programmi di allocazione degli organi hanno progressivamente attenuato l'importanza del ruolo del matching HLA e ciò è stato anche favorito dall'impiego di nuove tecnologie per il rilevamento di anticorpi donatore specifici (DSA).

Da uno studio di coorte del Collaborative Transplant Study (CTS) basato su 135.970 trapianti di rene è invece emerso che il matching HLA per quanto riguarda

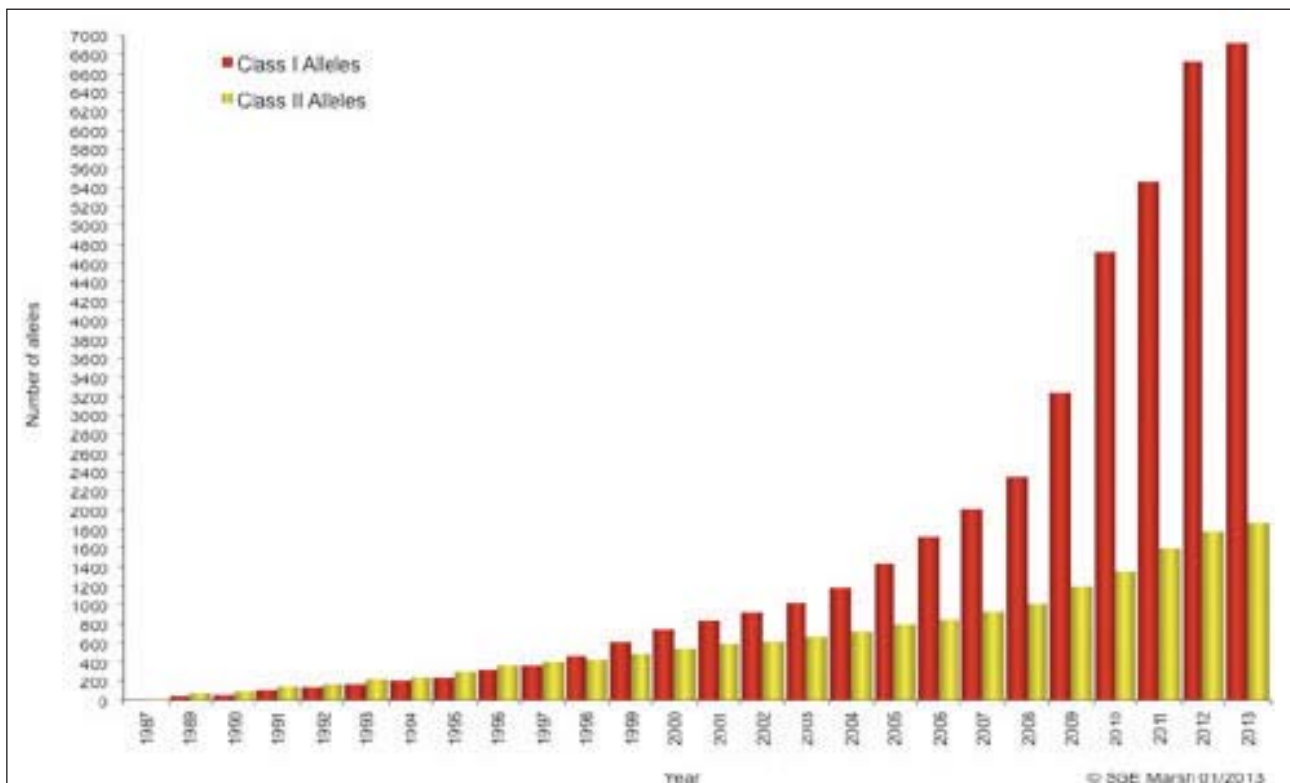


Fig. 1B. Numero totale di alleli HLA di classe I e di classe II al gennaio 2013. (IMGT / HLA).

la sopravvivenza del trapianto non ha perso di importanza, e che ciò appare più evidente quando vengono confrontati i decenni 1985-1994 e 1995-2004 (Opelz <http://www.smw.ch/index.php?id=1150-REF09> et al, 2007). Anche quando si analizzano separatamente gli ultimi 5 anni del periodo di studio (2000-2004), si ritrova sempre una correlazione significativa tra matching HLA e sopravvivenza del trapianto (Opelz <http://www.smw.ch/index.php?id=1150-REF09> et al, 2007). Un'analisi sui dati di base del Scientific Registry of Transplant Recipients (SR-TR) (1988-2007) ottenuti da più di 15.000 candidati a ritrapianto, ha evidenziato le conseguenze negative che una minore compatibilità HLA comporta sulla sopravvivenza del trapianto, dopo che a seguito del primo trapianto si era assistito a un aumento significativo dello sviluppo di anticorpi anti-HLA (PRA), proporzionalmente correlato al grado di incompatibilità HLA. Solo il 10% dei pazienti con zero HLA-A e-B mismatches si era sensibilizzato dopo perdita del trapianto, rispetto al 37% (con >30% di PRA) dei trapiantati con mismatch HLA (Meier-Kriesche et al, 2009).

Negli ultimi anni sono stati messi in evidenza anche il ruolo degli antigeni HLA-C e DQ in termini di sopravvivenza del trapianto o di sensibilizzazione (Tambur et al, 2010, Tran et al, 2011) e come l'immunogenicità degli antigeni HLA-A, -B incompatibili, in termini di numero di residui amminoacidi mismatches (mismatches epitopici) sia associata ad una migliore sopravvivenza del trapianto rispetto al matching convenzionale basato sulla tipizzazione HLA sierologica (Kosmoliaptsis et al, 2010).

La comprensione del ruolo nella sopravvivenza del trapianto di anticorpi anti-DP, frequentemente rilevati in pazienti renali sensibilizzati, richiede ulteriori valutazioni.

Basandosi su una migliore conoscenza dell'immunizzazione anti-HLA, è stato di recente sviluppato al computer un nuovo algoritmo denominato "HLA Matchmaker" (Duquesnoy 2011), rendendo possibile la valutazione di mismatches HLA accettabili ba-

sati su epitopi riconosciuti dagli anticorpi anti-HLA. Questi epitopi sono caratterizzati da residui amminoacidici cruciali, denominati "eplets". L'HLA matchmaker rappresenta un utile strumento di analisi per determinare l'istocompatibilità a livello epitopico che va oltre il classico algoritmo per la determinazione del matching HLA-A,-B,-DR

Cellule NK e polimorfismo dei recettori KIR

Cellule natural killer (NK)

Le cellule NK derivano da precursori CD34⁺/Lin⁻/Flt3⁺/c-kit⁺ e la loro maturazione completa, funzionale e fenotipica ha luogo nel midollo osseo. Le cellule NK sono una componente fondamentale dell'immunità innata (Abbas et al, 2012, Lanier 2005, Parham 2005) in grado di lisare cellule bersaglio per mezzo di granuli citotossici e di produrre citochine immunoregatorie come IFN- γ e TNF- α (Abbas et al, 2012, Lanier, 2005; Parham, 2005) senza bisogno di un riconoscimento antigene-anticorpo, né di una precedente sensibilizzazione. Le NK rappresentano il 5-25% delle cellule mononucleate circolanti e sono caratterizzate fenotipicamente dagli antigeni di superficie CD56⁺ e CD16⁺ e dall'assenza del co-recettore CD3. Si ritiene che rappresentino la prima linea di difesa del corpo umano contro le infezioni intracellulari e le cellule tumorali (Abbas et al, 2012, Lanier, 2005; Parham, 2005). Le cellule NK possiedono diversi recettori sulla superficie. Alcuni recettori emettono segnali di attivazione e altri segnali inibitori in base all'effetto che hanno sull'attività citotossica della cellula (Fig. 2) (Parham, 2005).

I geni KIR

I geni killer cell - immunoglobulin-like Receptor (KIR) sono localizzati nella regione genomica denominata "complesso di recettori leucocitari" dalla dizione anglosassone di "leucocyte-receptor complex" (LRC) sul cromosoma 19q13.4 (Parham, 2005; Parham, 2008) (Fig. 3).

La famiglia dei KIRs consiste di 15 geni che codifica-

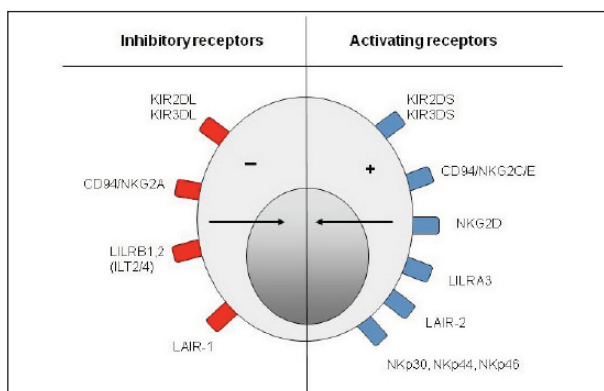


Fig. 2. Recettori delle cellule Natural killer. Le cellule Natural Killer esprimono recettori attivatori e inibitori appartenenti a specifiche famiglie di recettori come la famiglia KIR (da Swiss Med Wkly. 2012).

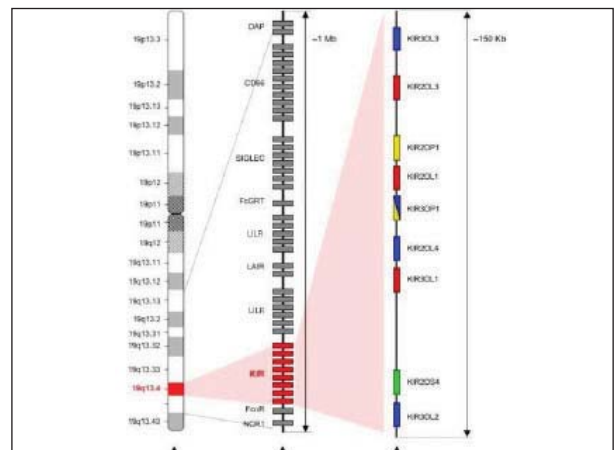


Fig. 3. Organizzazione genomica del complesso dei recettori leucocitari (LRC) ed un aplotipo KIR.

Gene Simbolo	Proteine Simbolo	Descrizione	Alias
KIR2DL1	KIR2DL1	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, lunga coda citoplasmatica, 1: prima proteina descritta in 2DL	47,11, CD158a, cl-42, nkat1, p58.1
KIR2DL2	KIR2DL2	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, lunga coda citoplasmatica, 2: seconda proteina descritta in 2DL	CD158b1, cl-43, nkat6
KIR2DL3	KIR2DL3	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, lunga coda citoplasmatica, 3: terza proteina descritta in 2DL	CD158b2, cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, P58
KIR2DL4	KIR2DL4	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, lunga coda citoplasmatica, 4: quarta proteina descritta in 2DL	15,212, 103AS, CD158d
KIR2DL5A	KIR2DL5A	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, lunga coda citoplasmatica, 5A: quinta proteina A descritta in 2DL	CD158f, KIR2DL5.1
KIR2DS1	KIR2DS1	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, breve coda citoplasmatica, 1: prima proteina descritta in 2DS	CD158h, EB6Actl, EB6Actll
KIR2DS2	KIR2DS2	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, breve coda citoplasmatica, 2: seconda proteina descritta in 2DS	183Actl, CD158j, cl-49, nkat5
KIR2DS3	KIR2DS3	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, breve coda citoplasmatica, 3: terza proteina descritta in 2DS	nkat7
KIR2DS4	KIR2DS4	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, breve coda citoplasmatica, 4: quarta proteina descritta in 2DS	CD158i, cl-39, KKA3, nkat8
KIR2DS5	KIR2DS5	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, breve coda citoplasmatica, 5: quinta proteina descritta in 2DS	CD158g, nkat9
KIR2DP1	KIR2DP1	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, due domini, uno pseudogene	KIR2DL6, KIR15, KIRy, KIRZ
KIR3DL1	KIR3DL1	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, tre domini, lunga coda citoplasmatica, 1: prima proteina descritta in 3DL	AMB11, CD158e1, cl-2, cl-11, KIR, nkat3, NKB1, NKB1B
KIR3DL2	KIR3DL2	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, tre domini, lunga coda citoplasmatica, 2: seconda proteina descritta in 3DL	CD158k, cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b
KIR3DL3	KIR3DL3	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, tre domini, lunga coda citoplasmatica, 3: terza proteina descritta in 3DL	CD158z, KIR3DL7, KIR44, KIRC1
KIR3DS1	KIR3DS1	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, tre domini, breve coda citoplasmatica, 1: prima proteina descritta in 3DS	CD158e2, nkat10
KIR3DP1	KIR3DP1	immunoglobulin-like receptor delle cellule NK, tre domini, pseudogene, 1	CD158c, KIR2DS6, KIR3DS2P, KIR48, KIRX

Tab. 1. I geni KIR (da IMGT/HLA).

no per KIRs attivatori o inibitori, e di due pseudo-geni che non codificano per proteine funzionali (Tabella 1).

Nel LRC i geni KIR sono organizzati in forma di aplotipi che variano a seconda del numero e del tipo di geni KIR presenti (Du et al, 2007, Parham, 2005); la segregazione di questi diversi aplotipi genera una grande varietà di geni KIR, ereditati da ciascun individuo. Come per i geni HLA, anche i geni KIR presentano un notevole polimorfismo (Parham, 2005; Parham, 2008) che influenza la loro espressione sulla superficie cellulare e la loro affinità per specifici ligandi.

Il vantaggio di tale variabilità è, probabilmente, la diversificazione della risposta immunitaria, in un contesto di patogeni a rapido cambiamento.

Una cellula NK esprime solamente una singola parte dei geni KIR presenti nel suo genoma (Lanier, 2005; Moretta et al, 2000).

La regolazione dell'espressione dei KIR

Affinché non vi siano cellule NK con una marcata tendenza ad essere inibite o, viceversa, attivate è fondamentale che il numero ed il tipo di recettori KIR inibitori ed attivatori espressi siano finemente controllati. La selezione dei recettori avviene secondo un meccanismo stocastico e questo fa sì che all'interno della popolazione NK di un individuo ogni clone riconosca un diverso repertorio di molecole HLA (Santourlidis et al, 2002). Il meccanismo molecolare che controlla l'espressione cellulo-specifica dei recettori è senza dubbio molto complesso, tuttavia è stato dimostrato che la metilazione del DNA svolge un ruolo importante nel mantenere il pattern di espressione dei KIR nell'ambito di ogni clone NK (Chan et al, 2000, Chan et al, 2003).

Ad eccezione del KIR2DL4, che viene espresso da tutte le cellule NK, gli altri geni KIR sono espressi da una frazione ristretta della popolazione NK, con modalità clonale (Valiante et al, 1997).

In cellule NK purificate da sangue periferico di donatori sani, l'analisi del promotore dei geni KIR non espressi ha evidenziato un'elevata frequenza di metilazione delle isole CpG. Nelle stesse cellule successivamente trattate con 5-aza-2'-deossicitidina, un inibitore delle DNA metiltransferasi (DNMT), è stata riscontrata l'espressione di quei geni KIR originariamente silenziati ed una consistente demetilazione dei loro promotori. Le DNMT, ovvero gli enzimi che catalizzano la metilazione del DNA, comprendono tre isoforme tra le quali DNMT1, che assicura il mantenimento del pattern di metilazione durante la replicazione, rappresenta quella maggiormente espressa (Valiante et al, 1997).

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che vi è una correlazione diretta tra la metilazione del promotore ed il silenziamento del gene KIR (Chan et al, 2000, Chan et al, 2003).

La metilazione non è però l'unico meccanismo epige-

netico responsabile del controllo dell'espressione dei geni; è stato, infatti, dimostrato che l'acetilazione degli istoni H3 ed H4, a livello di determinati residui aminoacidici, svolge un ruolo altrettanto importante. Inoltre, questi due meccanismi interagiscono tra loro in modo inverso e si suppone che operino in modo sequenziale. L'acetilazione degli istoni e la demetilazione del promotore sono correlate all'espressione del gene, mentre, al contrario, la deacetilazione degli istoni e la metilazione del promotore si accompagnano al silenziamento genico.

Ogni cellula NK esprime un suo proprio repertorio di recettori KIR e questo rende conto della grande eterogeneità di cellule NK all'interno di un individuo (Hadaya et al, 2010, Uhrberg 2005). Le proteine KIR sono recettori cellulari con funzione attivatoria (aKIRs) o inibitoria (iKIRs) (Figg. 2 e 4) (Lanier, 2005; Parham, 2005). I KIR sono costituiti da due o tre domini "immunoglobulin like" nella loro estremità extracellulare che servono come sito di interazione per il ligando specifico, da una regione transmembrana e da una regione citoplasmatica che è responsabile della trasduzione del segnale all'interno della cellula NK (Fig. 4).

A seconda del numero dei domini immunoglobulin-like i KIR sono denominati KIR2D o KIR3D. A seconda poi della lunghezza della coda citoplasmatica che può essere lunga o corta, i recettori sono chiamati KIR2DS (per la coda breve) o KIR2DL (per la coda lunga) (Fig. 4). In genere, la coda citoplasmatica lunga invia un segnale di inibizione e quella corta produce invece un segnale di attivazione all'interno della cellula NK. L'eccezione è rappresentata dal recettore KIR2DL4 perché può contemporaneamente genera-

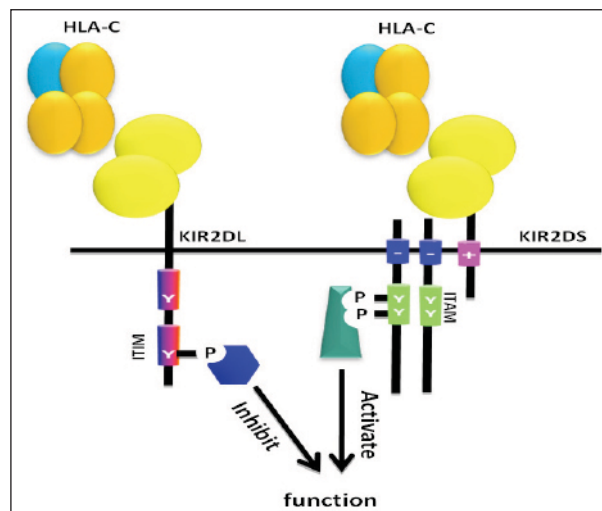


Fig. 4. L'attivazione e l'inibizione delle cellule NK. La proteina KIR può essere divisa in KIR attivatori (cioè KIR2DS [S in breve]) o in KIR inibitori (cioè KIR2DL [L per lungo]). Il segnale di attivazione e di inibizione è mediata dalla breve o dalla lunga la coda del recettore KIR dopo il legame con il ligando HLA-C. I motivi ITIM e ITAM guidano il segnale inibitorio e di attivazione, rispettivamente, da un processo di fosforilazione (Swiss Med Wkly. 2012).

re segnali sia di tipo attivatorio che inibitorio (Lanier, 2005; Moretta et al, 2005; Parham, 2005; Vivier et al, 2008) (www.ebi.ac.uk).

Regolazione dell'attività delle cellule NK attraverso i recettori KIR di tipo attivatorio e di tipo inibitorio

I KIR attivatori (aKIRs) riconoscono un gruppo eterogeneo di ligandi che sono espressi dalle cellule in fase di stress (per esempio in situazioni di infezioni intracellulari, trasformazione neoplastica) (Lanier, 2005; Parham, 2005): inducono l'attivazione delle cellule NK.

I KIR inibitori (iKIRs) si legano invece alle molecole HLA di classe I che sono espresse su tutte le cellule nucleate di soggetti sani (Tabella 2) (Lanier, 2005; Moretta et al, 2005; Parham, 2005; Parham, 2008). Compito dei iKIRs è quindi quello di inibire l'attivazione delle cellule NK. Le combinazioni più note tra i iKIRs e le molecole HLA di classe I sono rappresentate da:

- KIR2DL2 / 3 + HLA-C del gruppo C1 (C1/3/7/8) che porta una asparagina in posizione 80;
- KIR2DL1 + HLA-C del gruppo C2 (C2/4/5/6/15) che porta una lisina in posizione 80;
- KIR3DL1 + HLA-A/HLA-B con un epitopo sierologico Bw4;
- KIR3DL2 + HLA-A3 e HLA-A11.

L'integrazione finale di tutti i segnali KIR, generato da una varietà di recettori attivatori e inibitori al momento dell'interazione con la cellula bersaglio, determina il funzionamento o l'azione della cellula NK (Lanier, 2005; Parham, 2005). Le cellule NK sono in grado di discriminare una cellula sana che deve essere conservata da una cellula infettata o tumorale che deve essere eliminata (Parham, 2005; Karre, 1986). Le principali interazioni tra le cellule NK e le cellule bersaglio sono illustrate nella figura 5. I geni KIR sono localizzati sul cromosoma 19 e i geni HLA sul cromosoma 6, per cui l'eredità di queste famiglie distinte di geni polimorfici, genera diverse combinazioni di coppie iKIR-HLA di classe I negli individui (Parham, 2005; Rajalingam, 2008). Pertanto, è pos-

sibile che alcuni iKIRs non trovino ligandi specifici. Meno del 10% della popolazione possiede le quattro coppie di interazione iKIR-HLA di classe I descritte precedentemente. Tuttavia, solamente circa il 70% delle persone sono in possesso di due o tre coppie di iKIR-HLA di classe I mentre solo il 20% una sola coppia. Quindi, ogni cellula NK acquista una competenza funzionale, ma ha almeno un recettore inibitorio come iKIR che interagisce in maniera adeguata con il suo ligando (Parham, 2005; Vivier, 2008). Se la cellula non si adatta a questo criterio di selezione, la cellula NK rimane in uno stato di ipoattività, precludendo la sua attivazione, la sua azione difensiva contro le cellule autologhe e contro una potenziale risposta auto-immune (Vivier, 2008). Gli aKIRs sembrano svolgere un ruolo meno importante rispetto agli iKIRs per le funzioni delle cellule NK: non tutti gli individui posseggono aKIR, e sono comunque sani (Du et al, 2007). Gli aKIR possono anche legare ligandi HLA ma sempre meno fortemente rispetto agli iKIR. La maggior parte dei ligandi aKIR sono ancora sconosciuti. Alcuni aKIR sono in grado di legare alleli del locus HLA-C così come gli iKIR ma con meno affinità (come KIR2DS21 con alcuni alleli del gruppo 2 HLA-C e 2DS4 con pochi alleli principalmente del gruppo 1 HLA-C). Come regola generale, una singola cellula NK possiede più recettori inibitori che recettori attivatori (Lanier, 2005; Parham, 2005).

Riassumendo i KIR inibitori riconoscono come ligandi le molecole MHC di classe I (HLA) sulla superficie delle cellule e trasmettono un segnale di inibizione dell'attività citolitica delle cellule NK. I KIR attivatori in seguito al riconoscimento dei propri ligandi, mediano un segnale attivatorio che innesca l'azione citolitica delle cellule NK.

Quando i recettori inibitori legano gli HLA, in assenza dell'interazione tra il recettore attivatorio e il proprio ligando, si genera un netto segnale negativo che blocca l'azione citolitica contro la cellula bersaglio. Al contrario, l'impegno del recettore attivatorio in assenza dell'interazione tra i KIR inibitori e i propri

2DL1 e 2DS1	2DL2/3 e 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4	2DS4
HLA-C (gruppo2)	HLA-C (gruppo1)	HLA-Bw4	HLA-A	HLA-G	
C*02	C*01	B*08	A*03		C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
C*15		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Tab. 2. Geni KIR e rispettivi ligandi HLA.

ligandi genera un netto segnale d'attivazione che innesca la lisi della cellula bersaglio. Quando i recettori attivatori o i ligandi sono sovraespressi, oppure quando i self-ligandi MHC di classe I sono sottoespressi, evento caratteristico durante le infezioni o le trasformazioni tumorali, le interazioni tra ligandi e KIR attivatori predominano sulla debole interazione tra ligando e KIR inibitore, con il netto risultato dell'attivazione della cellula NK e la lisi della cellula target. Se invece predominano le interazioni tra HLA e KIR inibitori la cellula target è preservata dalla lisi.

Ruolo del polimorfismo KIR nei trapianti di organi solidi

I migliori risultati ottenuti dallo studio dell'alloreattività delle cellule NK riguardano il trapianto di cellule staminali emopoietiche ma recentemente l'attenzione si è focalizzata anche sul trapianto di organi solidi specialmente per quanto riguarda l'outcome del trapianto renale a breve termine. Le cellule NK possono infatti reagire contro il trapianto attraverso diversi meccanismi (Rajalingam, 2008; Villard, 2011):

a) se le cellule trapiantate non condividono le stesse

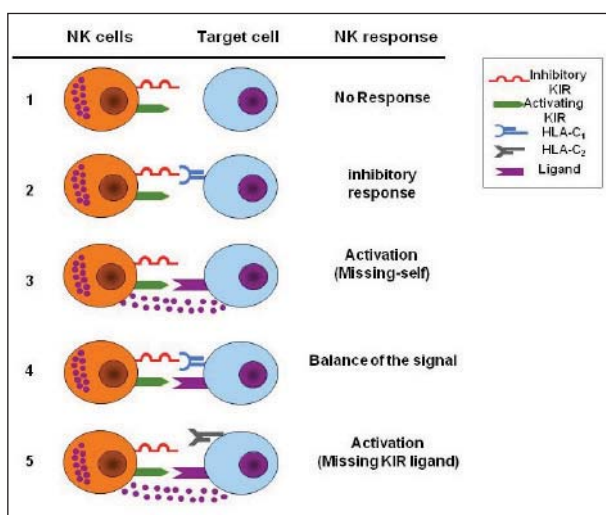


Fig. 5. La regolazione delle risposte delle NK. La risposta delle cellule NK dipende da un equilibrio tra recettori attivatori, recettori inibitori ed espressione del loro ligando sulla superficie delle cellule bersaglio. L'assenza del ligando è caratterizzata dall'assenza di segnale (1). L'espressione del ligando (HLA-C1 in blu come tipico esempio) per il recettore inibitorio (iKIR in rosso) è caratterizzata da un segnale inibitorio (2). L'assenza del ligando per il recettore inibitorio in presenza del recettore di attivazione con il loro ligando affine induce una attivazione delle cellule NK. Tale situazione prende il nome di "missing self" (3). Il bilanciamento dei recettori attivatori ed inibitori in presenza del loro ligando guiderà lo stato di attivazione delle cellule NK (4). La presenza di recettori di attivazione con il loro ligando in assenza del ligando specifico (HLA-C2 in grigio come esempio tipico) per il recettore inibitorio (iKIR in rosso) attiva le cellule NK. Tale situazione è chiamata "missing ligand" (5) (da Swiss Med Wkly. 2012).

molecole HLA di classe I con quelle del ricevente, le cellule NK rilevando il "missing self" o "il sé stesso perduto" (Fig. 5) si attivano e inducono la lisi delle cellule del donatore;

b) l'infiammazione causata durante l'intervento chirurgico del trapianto induce l'espressione di molecole da stress sulle cellule del trapianto che vengono riconosciute dai aKIRs ("induced - self killing" o "uccisione auto-indotta") che li rende suscettibili all'attacco delle cellule NK (Bromberg et al, 2010; van der Touw, 2010; Villard, 2011). Tuttavia, solo pochi studi hanno esaminato l'influenza che dei KIR e dei rispettivi ligandi HLA sull'"outcome" del trapianto. Altri studi hanno invece evidenziato una associazione statisticamente significativa tra KIR specifici/HLA-C e sopravvivenza nel trapianto di rene e di fegato (Hanvesakul et al, 2008; Kunert et al, 2007; Opelz et al, 2007). Questi effetti però non sono stati osservati in maniera sistematica in altri studi (Tran et al, 2005; Tran et al, 2009). Tali divergenze possono essere spiegate con le differenze che si riscontrano nella selezione delle coorti e soprattutto nella qualità della tipizzazione KIR/HLA, ma anche con l'evidenza di una certa complessità nelle interazioni cellulari HLA-NK. È stato anche suggerito che il ruolo svolto da questi recettori e dai rispettivi ligandi HLA possa avere una certa importanza nel contesto di un trapianto altamente compatibile HLA-A,-B,-DR (van Bergen et al, 2011). In aggiunta, il genotipo MHC del ricevente può anche essere importante per le cellule NK per il raggiungimento della loro maturità funzionale. Questo requisito per il KIR specifico-self MHC è stato denominato "licensing" (Vivier et al, 2008). Infatti, un paziente le cui cellule NK possiedono KIR2DL2/3 non è un ricevente idoneo per un organo da un donatore con HLA-C specifico per KIR2DL1. Il licenziamento delle cellule NK dipende soprattutto dalla specificità KIR/HLA-C, che a sua volta può variare ampiamente da una popolazione all'altra (Rajalingam, 2008; Villard, 2011). Inoltre, le cellule NK possono indurre una tolleranza immunologica all'organo trapiantato, attraverso l'eliminazione di APC del donatore, limitando l'attivazione delle cellule T alloreattive dal riconoscimento diretto (Bromberg et al, 2010, van der Touw et al, 2010, Yu et al, 2006). L'esatto ruolo dell'alloreattività delle cellule NK nel trapianto di organi solidi appare ancora controverso. I meccanismi che conducono alla attivazione delle cellule NK nel trapianto di organi solidi devono essere ancora chiariti. Il ruolo svolto dalle cellule NK è noto soprattutto nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche, in particolar modo per quanto riguarda la "graft-versus-leucemia" o GVL (Ruggeri et al, 1999; Ruggeri et al, 2007). Le cellule NK possono essere individuate in biopsie renali nei trapianti con rigetto acuto, mentre i trascritti "NK-type" possono invece indicare un rigetto anticorpo-mediato (Hidalgo et al, 2010). Queste osservazioni implicano la partecipazione indiretta delle cellule NK nella risposta immu-

nitaria al trapianto. Sono pertanto necessari ulteriori studi perché si possa valutare l'importanza clinica della compatibilità genetica NK fra recettori KIR del ricevente e ligandi HLA di classe I allo scopo di migliorare la sopravvivenza dei trapianti renali e la selezione dei pazienti che potrebbero beneficiare di un regime terapeutico ridotto.

Il polimorfismo delle citochine

Le citochine sono una classe eterogenea di proteine secretorie prodotte da vari tipi di cellule con la funzione di condizionare il comportamento di altre cellule specifiche verso cui sono indirizzate, comportandosi così da "mediatori". Il termine interleuchina o IL è stato inizialmente utilizzato per la denominazione di tali molecole ed ancora oggi molte delle citochine sono conosciute col termine di Interleuchine a cui sono stati attribuiti dei numeri progressivi. È possibile tuttavia identificare in questa famiglia di molecole molto eterogenee alcune caratteristiche generali comuni:

1. sono molecole prodotte essenzialmente durante la fase di attivazione e durante quella effettiva, sia dell'immunità naturale sia di quella specifica;
2. alla pari di altri ormoni peptidici, esercitano la loro attività legandosi a specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule bersaglio. La cellula bersaglio può essere la stessa produttrice (attività autocrina), una cellula vicina (attività paracrina) o una cellula lontana (attività endocrina);
3. I recettori per le citochine hanno un'affinità molto elevata. La loro espressione è regolata da specifici segnali esterni alla cellula, in genere costituiti dal-

la stessa o da altre citochine; nel caso dei linfociti, dal riconoscimento dell'antigene;

4. la secrezione delle citochine è un fenomeno breve ed autolimitato: non sono accumulate in granuli come molecole preformate ma prodotte de novo in seguito allo stimolo;
5. Numerose citochine sono prodotte da diverse linee cellulari ed agiscono su tipi cellulari diversi (pleiotropismo).
6. L'attività delle citochine è ridondante: diverse citochine possono avere la stessa azione biologica.
7. Molte citochine agiscono come regolatrici della divisione e della differenziazione cellulare.
8. Due citochine possono interagire tra di loro autoregolandosi, avere effetto additivo o effetto sinergico.

Dal momento che le azioni delle citochine sono molto varie (stimolanti, inibitorie, regolatorie), così come svariati sono i tipi cellulari sui quali agiscono, non è possibile realizzare una classificazione comprensiva di tutte le molecole finora conosciute e/o clonate e di tutti gli aspetti che le caratterizzano. Un criterio generalmente accettato è che questi fattori possono essere suddivisi in tre grandi famiglie sulla base del tipo di azione predominante:

- 1) le citochine a prevalente azione pro-infiammatoria (IFN- α e β o tipo 1, TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15);
- 2) le citochine con prevalente azione immunoregolatoria (IL-2, IL-4, IL-5, TGF- β , IFN- γ o tipo 2, 3);
- 3) le citochine a prevalente azione emopoietica (IL-3, GM-CSF, M-CSF, IL-7, IL-9, IL-11).

Nella Tabella 3 sono elencate le funzioni delle citochine. Poiché le citochine rivestono un ruolo fonda-

Citochine	Principali cellule secretorie	Azioni biologiche e cellulari
IL-6	macrofagi, cellule endoteliali, cellule T	• proprietà pro-infiammatorie e anti-infiammatorie • sintesi di proteine della fase acuta dal fegato • proliferazione delle cellule B che producono anticorpi • riduzione della produzione di IL-1 e di TNF-α
IL-10	monociti cellule T (Th2)	• pro-infiammatorie e anti-infiammatorie • inibizione dello sviluppo dei linfociti Th1 • aumento della risposta infiammatoria umorale • diminuzione della produzione di IL-1, TNF-α e IFN-γ • anergia delle cellule T
TNF- α	macrofagi cellule T	• potente azione pro-infiammatoria • attivazione delle cellule endoteliali e aumento delle molecole di adesione • aumento della permeabilità vascolare • attivazione e reclutamento di leucociti PMN sul sito infiammatorio • febbre (ipotalamo) • sintesi delle proteine della fase acuta da parte del fegato • apoptosi di numerosi tipi di cellule • stimolazione dell'angiogenesi • attività pro-trombotica
TGF- β 1		• stimolazione della fibrogenesi • inibitore della crescita di certi tipi cellulari

Tab. 3. Le citochine e i loro effetti biologici.

mentale nelle risposte infiammatorie ed immunitarie che mediano l'outcome dei pazienti sottoposti ad allotrapianto, molti lavori hanno avuto come scopo quello di indagare l'associazione tra determinati polimorfismi citochinici e lo sviluppo di complicanze (immediate, precoci o tardive) al trapianto di rene (Hoffmann et al, 2004; Hutchinson et al, 1999; Pawlik et al, 2005). Infatti, è ampiamente accettato dalla comunità scientifica che i livelli di produzione delle citochine, come di altre molecole implicate nella risposta immunitaria, possano essere modulati da polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) nei corrispondenti geni (Bidwell et al, 2001). Il polimorfismo può essere dovuto al cambiamento di un singolo nucleotide a livello della sequenza genetica (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Tali mutazioni si verificano sia in regioni codificanti che non codificanti, come il sito promotore, sito enhancer, sito di metilazione (regolazione epigenetica) o il sito di splicing dell'RNA (Fig. 6). Diversi SNPs sono stati identificati in tutti i geni delle citochine (Tiercy, 2011). Inoltre, anche i recettori delle citochine sono polimorfici.

Un significativo numero di lavori si è posto come obiettivo quello di capire se ed in che modo i polimorfismi genetici citochinici possano influenzare il livello di espressione genica. Nella totalità di questi è stata studiata l'espressione genetica "in vitro", esaminando la relazione tra gli alleli polimorfici o gli aplotipi dei geni citochinici e l'espressione del trascritto o della citochina. È opportuno precisare che sembra essere sempre più evidente come i risultati di questi studi di espressione genica possano essere fortemente influenzati da svariati fattori, come ad esempio la linea cellulare utilizzata nel saggio e il trattamento terapeutico dei soggetti prima del prelievo delle cellule sottoposte all'analisi (Bidwell et al, 2001). Nella Tabella 4 è mostrata la corrispondenza tra alcuni dei polimorfismi citochinici studiati e il livello di produzione proteica.

In base alle differenze inter-individuali nel livello di citochine prodotte in colture cellulari "in vitro", si distinguono individui high o low o intermediate produttori, presupponendo una relazione tra il genotipo

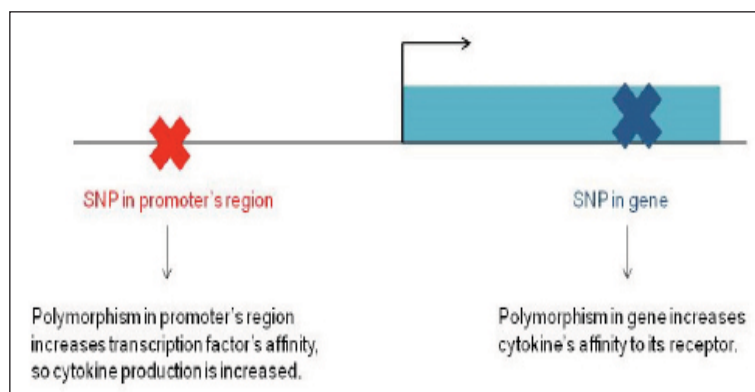


Fig. 6. Polimorfismo delle citochine. Gene codificante una citochina con rappresentazione di due polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP) nella regione promoter (X) e nel gene stesso (X).

Genotipo	Produzione "in vitro" dei livelli di citochine
IL-1 -511 CC CT TT	proinflammatory high intermediate low
IL-12 -1188 AA CA CC	proinflammatory high intermediate low
IFN- UTR 5644 AA AT TT	proinflammatory low intermediate high
TGF- 1 codon 10 CC CT TT	immunomodulatory low intermediate high
TGF- 1 codon 25 CC CG GG	immunomodulatory low intermediate high
TNF-308 AA GA GG	proinflammatory high high low
IL-2 -330 GG GT TT	proinflammatory high intermediate low
IL-4 -590 CC TC TT	immunomodulatory low intermediate high
IL-4 CC CT TT	immunomodulatory high intermediate low
IL-6 -174 CC GC GG	proinflammatory low intermediate high
IL-6 nt 565 AA GA GG	proinflammatory low intermediate high
IL-10 -1082 AA GA GG	immunomodulatory low intermediate high
IL-10 -819 CC CT TT	immunomodulatory high intermediate low
IL-10 -592 AA CA CC	immunomodulatory low intermediate high

Tab. 4. Genotipi citochinici e livello di espressione genica "in vitro".

citochinico e il profilo corrispondente di produzione proteica (Kruger et al, 2008). In termini generali, l'high, il low o l'intermediate livelli di produzione di citochine sono definiti attraverso la zigosità: omozigote high/high o low/low eterozigote high/low. In questo modo, il grado di zigosità determina il profilo di produzione citochinica nei pazienti trapiantati, che potrebbe avere un impatto sulla sopravvivenza dell'organo (McDaniel et al, 2003). Alcuni lavori hanno riportato un legame tra il polimorfismo IL-10-1082G / A ed l'outcome del trapianto renale (Asderakis et al, 2001) con un più basso rischio di rigetto associato al genotipo-1082GG (IL-10 high) e una maggiore incidenza di rigetto conferito dal genotipo-1082AA (IL-10 low). Altri studi hanno anche riportato che genotipi "high producers" (genotipi alti produttori) di TNF- α sono associati a più alti episodi di rigetto acuto dopo trapianto di rene (Goldfarb-Rumyantzev et al, 2008; Sankaran et al, 1999; Tinckam et al, 2005), ma questa associazione non è stata poi confermata da studi successivi (Tinckam et al, 2005; Alakulppi et al, 2004). È interessante notare che, nel più ampio studio pubblicato ad oggi, il genotipo "high producer" TNF- α -308A (genotipo alto produttore) è stato associato ad una più bassa sopravvivenza del trapianto nei pazienti con ritrapianto, ma non in quei pazienti con primo trapianto (Brabcova et al, 2007). Un altro studio su 436 pazienti, in cui sono stati valutati 9 SNPs ai loci di TNF- α , MCP-1, RANTES, IFN- γ e TGF- β non ha invece rivelato alcuna correlazione con l'outcome del trapianto renale (Alakulppi et al, 2004). In una me-

ta-analisi di 1.087 pazienti individuali sui polimorfismi del TGF- β , del IL-10 e del TNF, solo 2 aplotipi SNP IL-10-1082/819/-592ACC e TGF- β CC 10/25, erano associati a bassa sopravvivenza (Thakkinstian et al, 2008). L'impatto dei polimorfismi genetici delle citochine sul trapianto renale è ancora fortemente dibattuto (Dmitrienko et al, 2005; Kocierz et al, 2011) (Tabella 5). Quando si analizzano questi risultati, occorre tener presente che le citochine sono coinvolte in complesse cascate infiammatorie e immunologiche e che formano una rete complessa. Così, l'effetto di una isolata variabilità genetica in una citochina può essere difficile da individuare alla luce di meccanismi complessi che sono messi in gioco nei sistemi biologici come il rigetto. Nel trapianto di organi solidi, la risposta immunitaria non è solo determinata dalle attività delle citochine del ricevente ma anche da quelle del donatore (Marshall et al, 2001). Così come il polimorfismo NK, anche quelli delle citochine non rappresentano un criterio per la selezione del donatore o per l'identificazione di pazienti ad alto rischio di rigetto. Ulteriori studi sono necessari per far luce sul rapporto tra polimorfismo genetico delle citochine e l'outcome del trapianto di organi solidi.

Conclusioni

È ben noto che il fattore genetico più importante nel determinare l'outcome del trapianto renale è costituito dalla compatibilità HLA tra donatore e ricevente, in particolare per i loci HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1. Mentre i nuovi farmaci immunosoppressivi non sembrano compensare interamente l'ef-

Studio	Numero di pazienti	Genotipo	Risultati
Kocierz et al, 2011	199	Paziente -174GG/GC	aumento del rischio di perdita del trapianto a 5 anni
Muller-Steinhardt et al, 2004	158	Paziente -597/-572/-194 GGG / GGG Paziente -597/-572/-194 GGG / GCG	aumento della sopravvivenza del trapianto a 3 anni sopravvivenza del trapianto inferiore a 3 anni
Marshall et al, 2001	145	Donatore -174CC (low)	aumento dell'incidenza e della gravità degli episodi di rigetto acuto a 30 giorni
Marshall et al, 2001	145	Paziente - 174GG	nessuna associazione sul rigetto
Mittal et al, 2007	193	Paziente - 174GG	maggior rischio di malattia renale terminale
Nikolova et al, 2008	66	Donatore-174CC (low)	associazione con nefropatia cronica del trapianto
Martin et al, 2009	99	Paziente -174GG/GC	aumento della produzione di DSA
Hoffmann et al, 2004	242	Donatore -174GG/GC	nessuna associazione con il rigetto acuto
Alakulppi et al, 2008	772	Paziente / donatore -174GG/GC	nessuna associazione con rigetto acuto, tromboembolia, sopravvivenza del trapianto ad un anno

Tab. 5. Associazioni dei genotipi SNP IL-6-174G / C in riceventi e in donatori e outcome del trapianto di rene.

fetto deleterio della incompatibilità HLA, altri studi hanno evidenziato benchè con risultati contrastanti, come i polimorfismi dei recettori KIR delle cellule NK e i polimorfismi dei geni delle citochine siano in grado di svolgere un importante ruolo nell'outcome del trapianto anche se al momento il loro impatto clinico è ancora in discussione. Per l'effetto pleiotropico delle citochine e a causa dell'origine multigenica delle complicazioni post-trapianto, tali polimorfismi dovrebbero essere analizzati in varie combinazioni. In conclusione, la compatibilità HLA rappresenta ancora il criterio principale nei programmi di allocazione di organi e per il momento è ancora troppo presto per ricorrere alle combinazioni KIR / HLA e ai genotipi delle citochine negli algoritmi di assegnazione.

Dovrebbero inoltre essere presi in considerazione anche altri fattori non immunologici come il tempo ischemia e la durata della dialisi prima del trapianto. A causa della carenza di organi disponibili per il trapianto, nei vari centri trapianto la tendenza è oggi-giorno quella di allocare per la maggior parte dei pazienti organi solo parzialmente HLA-compatibili. Ovviamente, l'aggiunta di altri criteri immunogenetici potrebbe rendere il compito ancora più complesso e prolungare maggiormente il tempo in lista d'attesa soprattutto per quei pazienti con fattori genetici sfavorevoli. Tuttavia è da tenere presente che l'identificazione di altri marcatori genetici e la somministrazione di adeguati trattamenti immunosoppressivi potrebbero essere anche utili per diminuire il rischio di rigetto specie in quei riceventi ad alto rischio immunologico.

Bibliografia

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology, basic immunology; Functions and Disorders of the Immune System. *Elsevier, Philadelphia* 2012; 4th edition.
- Alakulppi NS, Kyllonen LE, Jantti VT, Matinlauri IH, Partanen J, Salmela KT et al. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78:1422-1428.
- Alakulppi NS, Kyllonen LE, Partanen J, Salmela KT, Laine JT. Lack of association between thrombosis-associated and cytokine candidate gene polymorphisms and acute rejection or vascular complications after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 364-368.
- Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ et al. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 674-677.
- Aydingoz SE, Takemoto SK, Pinsky BW, Salvalaggio PR, Lentine KL, Willoughby L, Hoover B, Burroughs TA, Schnitzler MA, Graff R. The impact of human leukocyte antigen matching on transplant complications and immunosuppression dosage. *Hum Immunol* 2007; 68: 491-499.
- 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; 2: 47-56.
- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huiinga T, McDermott MF et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* 2001;2: 61-70.
- Brabcova I, Petrasek J, Hribova P, Hyklova K, Bartosova K, Lacha J, Viklicky O. Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 1037-1044.
- Bromberg JS, Heeger PS, Li XC. Evolving paradigms that determine the fate of an allograft. *Am J Transplant* 2010; 10: 1143-1148.
- Chan MF, Liang G, Jones PA. Relationship between transcription and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249:75-86.
- Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 2003; 197:245-255.
- Clark B, Unsworth DJ. HLA and kidney transplantation. *J Clin Pathol* 2010; 63: 21-25.
- Dmitrienko S, Hoar DI, Balshaw R, Keown PA. Immune response gene polymorphisms in renal transplant recipients. *Transplantation* 2005; 80: 1773-1782.
- Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007; 59:1-15.
- Duquesnoy RJ. Antibody-reactive epitope determination with HLAMatchmaker and its clinical applications. *Tissue Antigens* 2011;77: 525-534.
- Goldfarb-Rumyantsev AS, Naiman N. Genetic prediction of renal transplant outcome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 573-579.
- Hadaya K, Avila Y, Vallotton L, de Rham C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Pascual M, Pantaleo G, Martin PY, Buhler L, Villard J. Natural killer cell receptor-repertoire and functions after induction therapy by polyclonal rabbit anti-thymocyte globulin in unsensitized kidney transplant recipients. *Clin Immunol* 2010; 137: 250-260.
- Halloran PF. The clinical importance of alloantibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 639-640.
- Hanvesakul R, Spencer N, Cook M, Gunson B, Hathaway M, Brown R et al. Donor HLA-C genotype has a profound impact on the clinical outcome following liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 1931-1941.
- Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel

- M, Einecke G et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010; 10: 1812-1822.
- Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, Mueher RJ, Lorentzen D, Kleiner D et al. Donor genomics influence graft events: effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2004; 66: 1686-1693.
- Hutchinson IV, Pravica V, Perrey C, Sinnott P. Cytokine gene polymorphisms and relevance to forms of rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 734-736.
- Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675-678.
- Kocierz M, Siekiera U, Kolonko A, Karkoszka H, Chudek J, Cierpka L, Wiecek, A. 174G/C interleukin-6 gene polymorphism and the risk of transplanted kidney failure or graft loss during a 5-year follow-up period. *Tissue Antigens* 2011; 77: 283-290.
- Kosmoliaptsis V, Sharples LD, Chaudhry A, Johnson RJ, Fuggle SV, Halsall DJ et al. HLA class I amino acid sequence-based matching after interlocus subtraction and long-term outcome after deceased donor kidney transplantation. *Hum Immunol* 2010; 71: 851-856.
- Kruger B, Schroppel B, Murphy BT. Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ. *Transplant Rev* 2008; 22:131-140.
- Kunert K, Seiler M, Mashregi MF, Klippert K, Schonemann C, Neumann K et al. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 1527-1533.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-274.
- Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, Gautreau C, Charron D, Glotz D. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Contrib Nephrol* 2009; 162: 1-12.
- Marshall SE, McLaren AJ, McKinney EF, Bird TG, Haldar NA, Bunce M et al. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2001;71: 469-476.
- Martin J, Worthington J, Harris S, Martin S. The influence of class II transactivator and interleukin-6 polymorphisms on the production of antibodies to donor human leucocyte antigen mismatches in renal allograft recipients. *Int J Immunogenet* 2009; 36: 235-239.
- McDaniel DO, Barber WH, Nguyen C et al. Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. *Transplant Immunology* 2003; 11: 107-119.
- Meier-Kriesche HU, Scornik JC, Susskind B, Rehman S, Schold JD. A lifetime versus a graft life approach redefines the importance of HLA matching in kidney transplant patients. *Transplantation* 2009; 88: 23-29.
- Mittal RD, Manchanda PK. Association of interleukin (IL)-4 intron-3 and IL-6 -174 G/C gene polymorphism with susceptibility to end-stage renal disease. *Immunogenetics* 2007;59: 159-165.
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 2000; 21: 420-422.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett* 2005; 100: 7-13.
- Mytilineos J, Laux G, Opelz G. Relevance of IL10, TGFbeta1, TNFalpha, and IL4Ralpha gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004; 4: 1684-1690.
- Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H, Hartel C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 2004; 4: 402-406.
- Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation – impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol* 2008; 18: 344-348.
- Opelz G, Dohler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 2007; 84: 137-143.
- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 201-214.
- Parham P. The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Semin Immunol* 2008; 20: 311-316.
- Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G et al. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol* 2005; 14: 49-52.
- Rajalingam R. Variable interactions of recipient killer cell immunoglobulin-like receptors with self and allogenic human leukocyte antigen class I ligands may influence the outcome of solid organ transplants. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 430-437.
- Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 333-339.
- Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: chal-

- lenging its predictive value. *Blood* 2007; 110: 433-440.
- Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999; 56:281-288.
- Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 2002; 169: 4253-4261.
- Su X, Zenios SA, Chakkera H, Milford EL, Chertow GM. Diminishing significance of HLA matching in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1501-1508.
- Tambur AR, Leventhal JR, Friedewald JJ, Ramon DS. The complexity of human leukocyte antigen (HLA)-DQ antibodies and its effect on virtual cross-matching. *Transplantation* 2010; 90: 1117-1124.
- Thakkinstian A, Dmitrienko S, Gerbase-Delima M, McDaniel DO, Inigo P, Chow KM et al. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 3017-3023.
- Tiercy JM. Immunogenetics of hematopoietic stem cell transplantation: the contribution of microsatellite polymorphism studies. *Int J Immunogenet* 2011; 38: 365-372.
- Tinckam K, Rush D, Hutchinson I, Dembinski I, Pravica V, Jeffery J, Nickerson P. The relative importance of cytokine gene polymorphisms in the development of early and late acute rejection and six-month renal allograft pathology. *Transplantation* 2005; 79: 836-841.
- Tran TH, Mytilineos J, Scherer S, Laux G, Middleton D, Opelz G. Analysis of KIR ligand incompatibility in human renal transplantation. *Transplantation* 2005; 80: 1121-1123.
- Tran TH, Middleton D, Dohler B, Scherer S, Meenagh A, Sleator C, Opelz G. Reassessing the impact of donor HLA-C genotype on long-term liver transplant survival. *Am J Transplant* 2009; 9: 1674-1678.
- Tran TH, Dohler B, Heinold A, Scherer S, Ruhenstroth A, Opelz G. Deleterious impact of mismatching for human leukocyte antigen-C in presensitized recipients of kidney transplants. *Transplantation* 2011; 92: 419-425.
- Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol* 2005; 42: 471-475.
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7:739-751.
- van Bergen J, Thompson A, Haasnoot GW, Roodnat JJ, de Fijter JW, Claas FH et al. KIR-ligand mismatches are associated with reduced long-term graft survival in HLA-compatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1959-1964.
- van der Touw W, Bromberg JS. Natural killer cells and the immune response in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 1354-1358.
- Villard J. The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J Innate Immun* 2011; 3: 395-402.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 503-510.
- Wissing KM, Fomegne G, Broeders N, Ghisdal L, Hoang AD, Mikhalski D, Donckier V, Vereerstraeten P, Abramowicz D. HLA mismatches remain risk factors for acute kidney allograft rejection in patients receiving quadruple immunosuppression with anti-interleukin-2 receptor antibodies. *Transplantation* 2008; 85: 411-416.
- Wujciak T, Opelz G. Evaluation of HLA matching for CREG antigens in Europe. *Transplantation* 1999; 68:1097-1099.
- Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med* 2006; 203:1851-1858.

Indirizzo per la corrispondenza: Dr. Sergio Barocci
via A. Robino 87/8 16142 Genova
e-mail: sergiobarocci@gmail.com
tel. 010.874863, cell. 340.7785365

Pervenuto l'8/09/2013

DETERMINAZIONE DELL'HCV Ag: STUDIO DI CORRELAZIONE CON IL DOSAGGIO DELL'HCV Ab E DELL'HCV RNA

M LANEVE, A LENTI, R CONSERVA

Laboratorio di Patologia Clinica, P.O. "SS. Annunziata", A.S.L. Taranto

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is a worldwide infection and is still the leading cause of chronic liver disease in Italy. Since 1991, the screening of blood donors has drastically reduced the incidence of HCV infection. Intravenous drug use and nosocomial or occupational exposures are the greatest risk factors for HCV infection today.

The virological diagnosis of infection with the hepatitis C virus (HCV) is based on the detection of specific anti-HCV antibodies. Anti-HCV immunoassays, however, cannot distinguish between acute, past, and persistent infections. Furthermore, residual false negative results are expected because of a long window of 45–68 days between HCV infection and seroconversion.

Therefore screening for HCV RNA is currently regarded as the method of choice for the confirmation of an active infection in both immunocompetent patients who are anti-HCV positive and immunocompromised individuals who may not mount an adequate antibody response. HCV RNA assays can be also used to distinguish spontaneously resolved from chronic infections and are crucial for monitoring HCV infections. Assays for the amplification of HCV RNA, however, are expensive and time-consuming and require sophisticated technical equipment and highly trained personnel.

We employed the recently developed Abbott ARCHITECT HCV antigen assay: this is a fully automated, chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). This procedure allows the determination of HCV core antigen during all phases of HCV infection and not only during the early stages, when antibodies are not yet detectable.

In conclusion, HCV Ag showed good correlation with HCV RNA. In addition, a combination of anti-HCV and HCV Ag can provide the best result validity.

Introduzione

In Italia l'epatite C è la causa prevalente di epatiti croniche, cirrosi, tumori primitivi del fegato, trapianto di fegato e decessi per progressione dell'epatopatia. Di fatto, è anche la causa principale di decessi per malattie infettive trasmissibili. L'infezione ha raggiunto la massima diffusione tra gli anni '60 e la metà degli anni '80, cioè negli anni antecedenti il 1990 quando l'HCV non era stato ancora scoperto e le regole per trasfusione ed interventi chirurgici non erano così rigide (Gardini I, et al, 2012).

Dopo tale periodo è iniziato un progressivo declino dell'incidenza dell'infezione legato principalmente alle migliorate conoscenze delle vie di trasmissione, alla diffusione dei dispositivi medico-sanitari monouso e, più in generale, al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie e socio-economiche nella popolazione. Ad oggi, il principale fattore di rischio per la trasmissione dell'HCV è l'uso di droghe per via endovenosa, ma lo sono anche gli interventi chirurgici, i trattamenti estetici, tatuaggi e piercing effettuati in ambienti in cui non vengono seguite le corrette pratiche di sterilizzazione degli strumenti (Gardini I, et al, 2012).

Purtroppo, per decenni il virus ha avuto il tempo di diffondersi e cronicizzare, causando un cospicuo numero di malati. Sebbene non esista una stima precisa della prevalenza dei soggetti infettati dal virus C in Italia, è verosimile che i soggetti che sono entrati in

contatto con il virus siano circa il 3% della popolazione e si stima che circa 1,5 milioni di persone potrebbero essere portatori di questo virus (Gardini I, et al, 2012; Gasbarrini A, et al, 2012; Rossi A, et al, 2009).

Nello specifico, la prevalenza d'infezione HCV (cioè il numero di pazienti con epatite cronica) nel nostro Paese è fortemente associata con l'area geografica e l'età secondo un "effetto coorte", e raggiunge punte particolarmente elevate nella popolazione anziana di alcune regioni del Sud Italia. Ad esempio in Campania, Puglia e Calabria, nei soggetti con età superiore a 70 anni, la prevalenza raggiunge, e in alcune aree supera, il 20 per cento (Gasbarrini A, et al, 2012; Rossi A, et al, 2009). Questo proprio perché in passato il virus ha avuto modo di diffondersi nei giovani-adulti attraverso le trasfusioni di sangue infetto, l'uso degli strumenti medico-sanitari non adeguatamente sterilizzati e la tossicodipendenza (Gardini I, et al, 2012).

Le nuove infezioni sono in continua diminuzione ma sfortunatamente il numero dei pazienti cronicamente infetti che non conoscono la propria condizione di patologia (e quindi possono avere una progressione subdola della malattia verso forme avanzate) e coloro i quali non hanno avuto un beneficio dalla terapia antivirale, rimane elevato. In questi pazienti la malattia può progredire: se non curati, si stima che nei prossimi 10/15 anni si dovrà far fronte ad un elevato

numero di pazienti con malattia avanzata che richiederanno cure sofisticate e costose per l'epatocarcinoma o lo scompenso epatico e che un numero consistente di casi potrebbero richiedere un trapianto di fegato (Gardini I, et al, 2012).

Attualmente medici e ricercatori hanno a disposizione nuovi e potenti armi contro l'HCV. Queste sono rappresentate, in primis, da due farmaci di ultima generazione introdotti nel 2012 anche in Italia e che promettono di eliminare l'infezione e comunque di guarire un numero sempre più crescente di persone (Gasbarrini A, et al, 2012).

I nuovi farmaci sono due agenti antivirali diretti (anche detti Daa, Direct antiviral agents) specifici per il virus dell'epatite C. Il loro meccanismo d'azione è molto diverso dai farmaci che costituivano, fino ad oggi, l'unica terapia disponibile contro HCV (*interferone + ribavirina*).

I due antivirali, *telaprevir* e *boceprevir*, hanno un'azione diretta proprio sulla replicazione del virus nell'organismo del paziente, mediante inibizione di alcune proteasi virali. Con la terapia tradizionale (peg-interferone+ribavirina) si ottiene il 70-80% di eradicazione di HCV G2 e G3 (le forme di infezione più facilmente trattabili) e il 40% di HCV G1 (il più difficile da trattare).

L'avvento dei nuovi farmaci antivirali diretti attivi sul genotipo I consente di elevare questa percentuale di guarigione al 65-75 per cento. Questo rappresenta una vera rivoluzione nell'ambito della terapia dell'HCV in quanto eleverà di molto le possibilità di eradicazione del virus. Inoltre, è di sostanziale importanza anche in considerazione dei costi di gestione delle malattie epatiche, che incrementano in modo esponenziale con l'aggravarsi della patologia (Gasbarrini A, et al, 2012).

Altra importante risorsa è costituita dai nuovi test di laboratorio sempre più efficaci per una corretta e rapida diagnosi.

La diagnosi di infezione da HCV è fondata sulla determinazione degli anticorpi anti-HCV (HCVAb). Tuttavia, i test immunologici anti-HCV non distinguono tra infezione acuta, cronica e in atto (Kamal SM, 2008). Inoltre, si possono avere falsi negativi a causa di un periodo finestra lungo 45-68 giorni tra l'infezione da HCV e la sierconversione (Miedouge M, et al, 2010; Ross RS, et al, 2010).

Pertanto, la determinazione dell'HCV-RNA è considerato il gold standard per la conferma di un'infezione in atto sia in pazienti immunocompetenti che sono anti-HCV positivi sia in individui immunocompromessi che non possono produrre un'adeguata risposta anticorpale (Kamal SM, 2008; Glynn SA, et al, 2005; Morota K, et al, 2009; Chevaliez S and Pawlotsky JM, 2005; NIH, 2002). Inoltre i test per l'HCV-RNA possono anche essere usati per distinguere le infezioni croniche da quelle che si sono risolte in maniera spontanea e sono fondamentali per il monitoraggio

delle infezioni da HCV (KDIGO, 2008). Tuttavia i test per l'amplificazione dell'RNA del HCV sono costosi, richiedono tempo e sofisticate attrezzature tecniche e personale altamente qualificato (Kamal SM, 2008).

Da circa due anni è disponibile un test sierologico che consente la determinazione di un antigene specifico di HCV, e precisamente l'antigene "core" (HCVAg), cioè della parte più interna del virus, strettamente legato ad HCV-RNA.

Le evidenze dalla letteratura scientifica indicano che questo test è molto specifico (KDIGO, 2008; Ross RS, et al, 2010; Scott JD and Gretch DR, 2007) e ne confermano la sensibilità elevata, equivalente ad una concentrazione di circa 1.000 unità internazionali di HCV-RNA (Kamal SM, 2008; Ross RS, et al, 2008; Richter S, 2002; Scott JD and Gretch DR, 2007). La stretta associazione con HCV-RNA dà anche luogo ad un'elevata correlazione tra i risultati ottenuti con i due metodi (Gasbarrini A and Cicchetti A, 2012; Kamal SM, 2008; Ross RS, et al, 2010; Richter S, 2002; Scott JD and Gretch DR, 2007).

Per la determinazione dell'HCVAg si usa la stessa metodologia e strumentazione dei test per anti-HCV. Inoltre, essendo un test completamente automatizzato non necessita di competenze professionali specializzate per poter essere eseguito, i risultati sono ripetibili e disponibili in soli 36 minuti, con una cadenza analitica di circa 200 test/ora.

Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio, svolto presso il Laboratorio di Patologia Clinica del P.O. SS. Annunziata di Taranto da gennaio a giugno 2013, è stato: 1) determinare l'HCVAg sul siero di pazienti risultati positivi per HCVAb; 2) mettere in correlazione i risultati ottenuti con il dosaggio dell'HCVAb e con il dosaggio dell'HCVAg; 3) mettere in correlazione i risultati ottenuti con il dosaggio dell'HCV-RNA quantitativo con il dosaggio dell'HCVAg.

Materiali e metodi

Per valutare l'utilità clinica del dosaggio dell'HCVAg associato a quello dell'HCVAb, abbiamo esaminato 50 pazienti (ambulatoriali e ricoverati) risultati positivi al dosaggio qualitativo degli HCVAb. Questi sono stati successivamente testati per la determinazione quantitativa dell'HCVAg su sistema analitico Architect i4000srPlus Abbott.

Architect HCV Antigene è un dosaggio immunologico chemiluminescente a cattura di microparticelle (CMIA) completamente automatizzato, che comprende un pretrattamento chimico automatizzato dei campioni di siero che consente la dissociazione di immunocomplessi antigene- anticorpo e la lisi delle particelle virali, esponendo così tutto l'antigene dell'HCV presente nel campione. Questa procedura permette la determinazione dell'antigene core dell'HCV durante tutte le fasi di infezione da HCV e non solo durante le

prime fasi, quando gli anticorpi non sono ancora rilevabili (Ross RS, 2010; Mederacke I, et al, 2009). Il test fornisce risultati quantitativi, espressi sia in femtomoli per litro o in picogrammi per millilitro: il limite di quantificazione è 3 fmol/l (0,06 pg/ml) e il limite superiore è 20.000 fmol/l, con la possibilità di diluizione automatica 1: 9 che estende la linearità del test a 180.000 fmol/l. Pertanto i campioni con concentrazione ≥ 3 fmol/l sono stati considerati reattivi per l'HCVAg. I campioni con S/CO ≥ 1 sono stati considerati reattivi per l'HCVAb.

Successivamente, abbiamo condotto uno studio di correlazione tra il dosaggio di HCV-RNA e HCVAg. Abbiamo esaminato 44 pazienti (ambulatoriali e ricoverati) di cui 41 sono risultati positivi al dosaggio dell'HCV-RNA quantitativo (eseguito con metodo P.C.R. TaqMan real time, Roche) e 3 sono risultati negativi. Questi sono stati poi testati per la determinazione quantitativa dell'HCVAg, utilizzando sempre il sistema analitico Architect i4000srPlus.

Risultati

Dallo studio fatto per valutare l'utilità clinica del dosaggio dell'HCVAg associato a quello dell'HCVAb, abbiamo ottenuto che dei 50 pazienti testati, 26 pazienti erano HCVAb positivi e HCVAg positivi (52%); 8 pazienti erano HCVAb (>10 S/CO) positivi e HCVAg negativi (16%); 16 pazienti erano HCVAb (<10 S/CO) positivi e HCVAg negativi (32%); 21 pazienti erano HCVAb (>10 S/CO) positivi e HCVAg positivi (42%); 5 pazienti erano HCVAb (<10 S/CO) positivi e HCVAg positivi (10%).

Successivamente abbiamo confrontato il dosaggio HCVAg con il test HCV-RNA quantitativo.

Il dosaggio HCVAg è stato saggiato con 44 campioni di pazienti che avevano precedentemente effettuato il test HCV-RNA quantitativo.

Abbiamo ottenuto che dei 44 pazienti testati: 41 pa-

zienti risultati positivi al test HCV-RNA quantitativo (≥ 15 UI/ml), sono risultati positivi anche all'HCVAg (≥ 3 fmol/l) eccetto uno; 3 pazienti, con carica virale non rilevabile (≤ 15 UI/ml), sono risultati negativi anche all'HCVAg (≤ 3 fmol/l).

I risultati ottenuti sono stati confrontati in una retta di regressione lineare in grado di interpretare il grado di correlazione fra i due metodi: $y=0,001x + 1603,6$; coefficiente di correlazione $r=0.4928$.

Discussione e conclusioni

I metodi per la rilevazione degli anticorpi del virus dell'epatite C (HCVAb) presentano alti tassi di falsi positivi, soprattutto nelle popolazioni a bassa prevalenza. Pertanto altri tests quali il RIBA, ma specialmente l'HCV- RNA PCR sono usati per la conferma di tests di screening anticorpali.

È noto che gli HCVAb, indicatori di avvenuta infezione da HCV, compaiono solo dopo settimane dall'inizio della malattia e persistono anche per molti anni dopo la guarigione. Quindi una negatività per HCVAb non esclude l'infezione e una positività non è sempre espressione di infezione in atto. L'HCVAg è un marcatore stabile di replicazione virale, infatti, è

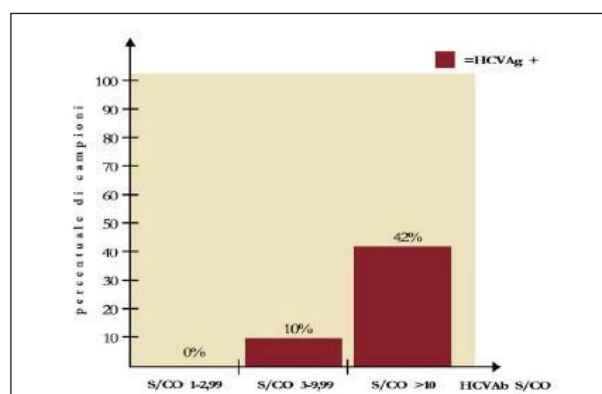


Fig. 1. Positività dell'HCV Ag per S/CO HCV Ab.

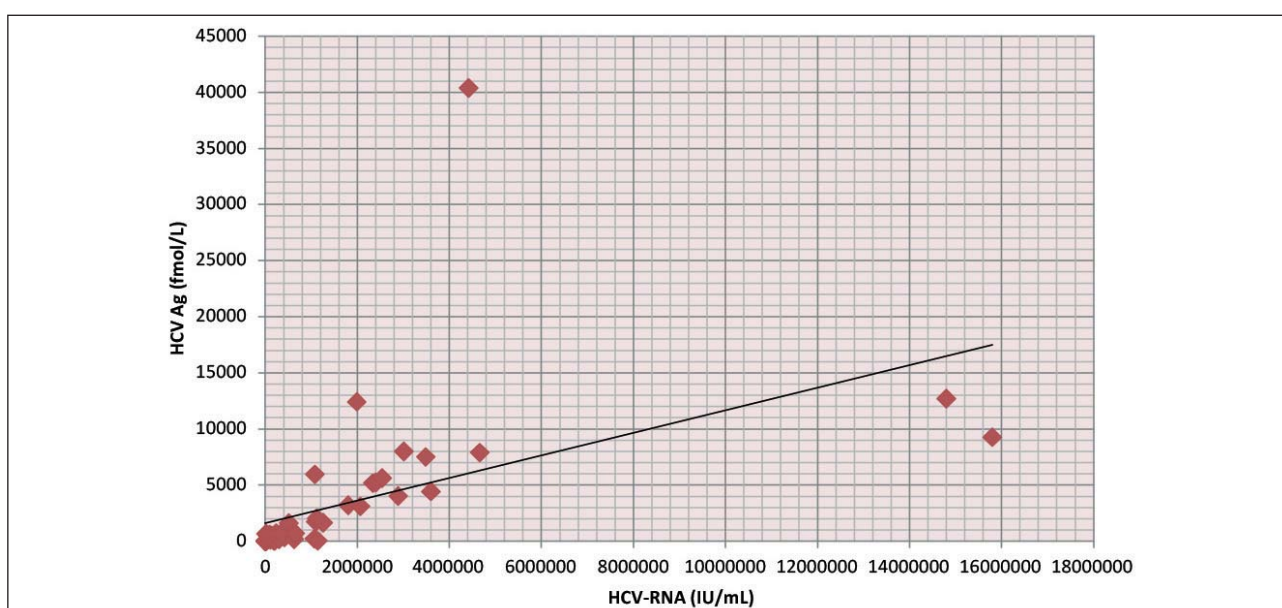


Fig. 2. Correlazione HCV Ag e HCV-RNA quantitativo.

rilevabile nel siero molto prima della comparsa dell'HCVAb e pertanto consente di identificare l'infezione in fase precoce, riducendo il periodo "finestra". Inoltre, poiché l'infezione da HCV, acuta o cronica, è caratterizzata dalla presenza dell'HCVAg, la sua assenza esclude l'infezione in atto, anche in caso di positività per gli HCVAb.

I dati ottenuti dal nostro studio, ci permettono di sottolineare l'importanza dell'impiego simultaneo dei due dosaggi, HCVAb e HCVAg, al fine di ottimizzare la diagnostica di laboratorio delle infezioni da HCV.

Infatti, il test HCVAg mostra una discreta correlazione con il test HCV-RNA quantitativo: all'innalzarsi della carica virale corrisponde un innalzamento dell'antigenemia e viceversa in caso di decremento. I risultati ottenuti incoraggiano l'uso dell'HCVAg test: per lo screening di popolazioni ad alto rischio (dializzati, emofiliaci o immunocompromessi), per confermare le infezioni attive, per differenziare tra infezioni in atto e pregresse, per monitorare la terapia antivirale attraverso la rilevazione precoce delle risposte positive al trattamento farmacologico. Inoltre l'HCVAg, oltre ad essere un test di elevata specificità e sensibilità, è anche completamente automatizzato e non necessita di particolari competenze professionali. Ciò comporta un vantaggio sia in termini di tempo (risultati analitici disponibili in 36 minuti e quindi TAT più breve) che di costi rispetto alla biologia molecolare.

Bibliografia

Chevaliez, S., and J.-M. Pawlotsky. Use of virological assays in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2005; 9:371–382

Gardini I, Conforti M, Fontana R, Fagioli S, Baldan A, Viganò M. Epatite C. L'informazione ti protegge. Associazione EpaC Onlus; U.S.C. Gastroenterologia Ospedali Riuniti, Bergamo; U. O. Epatologica Ospedale S. Giuseppe, Milano. Novembre 2012.

Gasbarrini A, Cicchetti A. WEF-E 2012: nuovi farmaci anti-HCV sotto la lente per assicurare trattamenti sostenibili ed efficaci. *24 ORE Sanità*, n. 15, Aprile 2012, p. 5-7.

Glynn SA, Wright DJ, Kleinman SH, Hirschhorn D, Tu Y, Heldebrandt C, et al. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion* 2005;45(6):994–1002.

Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(5): 1283–97 [quiz 1298].

KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of

hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2008; 109: S1–99.

Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, De Luigi C, Crovari P: Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3110–3114.

Mederacke I., Wedemeyer H., Ciesek S., Steinmann E, Raupach R, Wursthorn K., Manns M., Tillmann H.L. Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV-core antigen assay. *Journal of Clinical Virology* 2009; 46: 210–215.

Medici MC, Furlini G, Rodella A, Fuertes A, Monachetti A, Calderaro A, Galli S, Terlenghi L, Olivares M, Bagnarelli P, Costantini A, De Conto F, Sainz M, Galli C, Manca N, Landini MP, Dettori G, Chezzi C. Hepatitis C virus core antigen: Analytical performances, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay. *Journal of Clinical Virology* 2011; 51: 260– 265.

Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostaing L, Izopet J: Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *Journal of Clinical Virology* 2010; 48: 18–21.

Morota K., Fujinami R., Kinukawa H., Machida T., Ohno K., Saegusa H., Takeda K.: A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *Journal of Virological Methods* 2009; 157: 8–14.

National Institutes of Health. NIH consensus statement on management of hepatitis C. NIH Consens. State. Sci. *Statements* 2002; 19:1–46.

Richter, S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4407–4412.

Ross R.S., Viazov S., Salloum S., Hilgard P., Gerken G. and Roggendorf M.: Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of a Novel Assay for Total Hepatitis C Virus Core Antigen Quantification. *Journal of Clinical Microbiology* Apr. 2010, p. 1161–1168.

Rossi A, Ubaldi E, Cricelli C, Gasbarrini A, Prati D, Carosi G, Puoti M, Mazzotta F. Documento intersocietario SIMG – AISF – SIMIT sul virus dell'epatite C. *Rivista della Società Italiana di Medicina Generale* 2009, 4: 16 – 27.

Scott, J. D., and D. R. Gretch. 2007. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA* 297:724–73.

Pervenuto il 29/10/2013

SIERODIAGNOSI DI WIDAL-WRIGHT: SCREENING IN AUTOMAZIONE IN PROVETTA SU FREEDOM EVO CLINICAL 150 TECAN

ALBERTO MICILLO, ADOLFO RUSSO, GIUSEPPE MICILLO*

Laboratorio di Patologia Clinica - AORN "Santobono-Pausilipon" - Napoli

*Facoltà di Farmacia dell'Ateneo Federico II - Napoli

Riassunto

La sierodiagnosi di Widal-Wright è un'indagine utilizzata nella diagnostica della febbre tifoide e della brucellosi. Ancora oggi in molti laboratori viene eseguita manualmente in provetta od in micropiastra, con conseguente dispendio di tempo e impiego di personale dedicato. Gli Autori propongono di trasformare la metodica manuale "classica" semiquantitativa, a 7 diluizioni in provetta, in una metodica qualitativa "di screening", a 2 diluizioni, sempre in provetta, automatizzata sul diluitore FREEDOM EVO CLINICAL 150 TECAN. Sono state condotte preliminarmente prove di precisione e di accuratezza per saggiare l'affidabilità del diluitore nella dispensazione di volumi di siero estremamente esigui. Ripetibilità e riproducibilità sono risultate eccellenti. Successivamente è stata valutata la concordanza dei valori ottenuti con le due metodiche "Classica" e "di Screening" su 367 campioni di siero provenienti da pazienti pediatrici, pervenuti presso la nostra AORN "Santobono-Pausilipon", con sospetto di febbre tifoide o brucellosi. Le prove sono state effettuate in parallelo per un periodo di sei mesi, utilizzando gli stessi reattivi. I dati sperimentali hanno evidenziato una concordanza diagnostica del 100% tra i valori finali ottenuti con le due metodiche, senza nessuna differenza, né quantitativa, limitatamente ai titoli 1:50 ed 1:100, né qualitativa, relativamente all'impiego delle singole sospensioni batteriche. In conclusione, il metodo di screening può tranquillamente sostituire quello classico. Infatti non penalizza la tempestività della diagnosi, non necessita nell'esecuzione di supervisione di personale dedicato, limita gli errori analitici ed è particolarmente vantaggioso economicamente.

Summary

The serodiagnosis of Widal -Wright is a research used in the diagnosis of typhoid fever and brucellosis. Even today in many laboratories is performed manually in a test tube or microtiter plate, resulting in time-consuming and the use of dedicated staff. The authors propose to transform the manual method "classic" semiquantitative, 7 dilutions in test tubes, in a qualitative method "screening", 2 dilutions, always in a test tube, the automated diluter FREEDOM EVO CLINICAL 150 TECAN. Were conducted preliminary tests of precision and accuracy in order to test the reliability of the diluter in the dispensation of volumes of serum extremely small. Repeatability and reproducibility were excellent. She was subsequently evaluated the correlation of the values obtained with the two methods "Classic" and "Screening" of 367 serum samples from pediatric patients received at our AORN "Santobono-Pausilipon" with suspected typhoid fever or brucellosis. The tests were carried out in parallel for a period of six months, using the same reagents. The experimental data showed a 100% diagnostic agreement between the final values obtained with the two methods, with no difference, nor quantitative, limited to securities 1:50 and 1:100, or qualitative, as regards the use of individual bacterial suspensions. In conclusion, the screening method can safely replace the classical one. In fact, it does not penalize the timeliness of diagnosis, does

not require the execution of supervision of dedicated staff, limited analytical errors and is particularly advantageous economically.

Introduzione

La sierodiagnosi di Widal-Wright è costituita dall'unione di due esami sierologici: la sierodiagnosi di Widal e quella di Wright, la prima utilizzata nella diagnostica della febbre tifoide, la seconda in quella della brucellosi (Bradley, 1996; Coulter, 1996; David et al, 1994; Edward, 1995; Zagami et al, 1988). Il test consiste nel cimentare diluizioni scalari di siero del soggetto in esame con un equivalente volume di sospensioni di Salmonelle (S. Typhi, S. Paratyphi A e B) e Brucelle spp. In particolare per le Salmonelle si utilizzano sospensioni separate per l'Antigene O (somatico) e per l'Antigene H (flagellare).

La presenza di anticorpi specifici è rilevata dall'agglutinazione verso i vari antigeni dei microrganismi inattivati presenti nelle sospensioni (Lateef e Aprileona, 2000; Ley et al, 2010; Nicoletti, 1981; Taiwo et al, 2007; Young, 1991).

La lettura dell'avvenuta reazione è facilitata dall'impiego di sospensioni di germi sottoposte a colorazione intravitale. La positività della sierodiagnosi si manifesta clinicamente all'inizio della seconda settimana di malattia e tale può mantenersi per qualche mese ed è espressa in modo semiquantitativo dal reciproco del titolo della provetta in cui sono ancora visibili agglutinati (De Lalla, Orlando et al, 2004; De

Lalla, Rizzardini et al, 2004; Washington, 1991). Ancora oggi questa metodica viene eseguita manualmente in gran parte dei laboratori di patologia clinica, sia adottando la tecnica in provetta, sia quella in micropiastra; in ambedue i casi, però, lo svolgimento del test risulta estremamente indaginoso. Infatti per la sua esecuzione è richiesta sia una notevole attenzione da parte dell'operatore nell'allestimento delle varie diluizioni scalari di siero, con un conseguente dispendio di tempo/lavoro, sia l'impiego di personale dedicato che viene sottratto alla normale routine di laboratorio.

Scopo dello studio

Presso il nostro Laboratorio di Patologia Clinica, a cui afferisce un'utenza prevalentemente pediatrica, la determinazione della sierodiagnosi di Widal-Wright viene eseguita manualmente con il metodo in provetta. In considerazione della indaginosità del test sierologico, della frequente richiesta e della esiguità di personale in forza al laboratorio, al fine di ottimizzare le risorse umane, di migliorare i tempi di esecuzione del test e di ridurre gli errori analitici, si è valutata la possibilità di trasformare la metodica "classica" semiquantitativa, a 7 diluizioni in provetta, eseguita manualmente, in una metodica qualitativa "di screening", a 2 diluizioni, sempre in provetta, ma effettuata in automazione, con l'ausilio di un diluitore programmabile.

Sono state effettuate preliminarmente prove di precisione e di accuratezza, in modo da testare l'affidabilità del diluitore nella erogazione di volumi estremamente ridotti di campione.

Successivamente, dopo implementazione della nuova metodica "di screening", è stata valutata la concordanza dei risultati ottenuti con il metodo proposto dagli Autori e quello "classico", in uso presso il nostro laboratorio.

Materiali e metodi

Lo studio è stato effettuato con l'impiego del diluitore automatico a 8 aghi indipendenti FREEDOM EVO CLINICAL 150 della ditta TECAN, su gentile concessione della ditta SIEMENS, che lo utilizza per l'esecuzione delle proprie metodiche immunoenzimatiche in micropiastra ed in uso presso il nostro Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale Santobono di Napoli.

Operativamente, il piano di lavoro del FREEDOM EVO CLINICAL 150, che è condiviso nella programmazione con altre metodiche immunoenzimatiche, è stato ripartito in 2 zone: una **zona sieri+diluizioni**, occupata da 14 racks lineari a 16 posti, in dotazione al diluitore, impiegati ciascuno per un singolo campione di siero con le relative diluizioni scalari ed una **zona reattivi**, occupata da 3 racks lineari a 3 posti, anch'essi in dotazione al diluitore, dedicati ai reagenti (Foto 1); tra le due zone è interpolata la stazione per il lavaggio degli aghi di dispensazione.

Nella **Figura 1** viene riportato lo schema del Piano di lavoro del diluitore con evidenziate la disposizione delle zone riservate alla metodica di Widal-Wright.



Foto 1. Rack Lineare a 16 posti (Sieri e Diluizioni) e Rack Lineare a 3 posti (Reattivi).

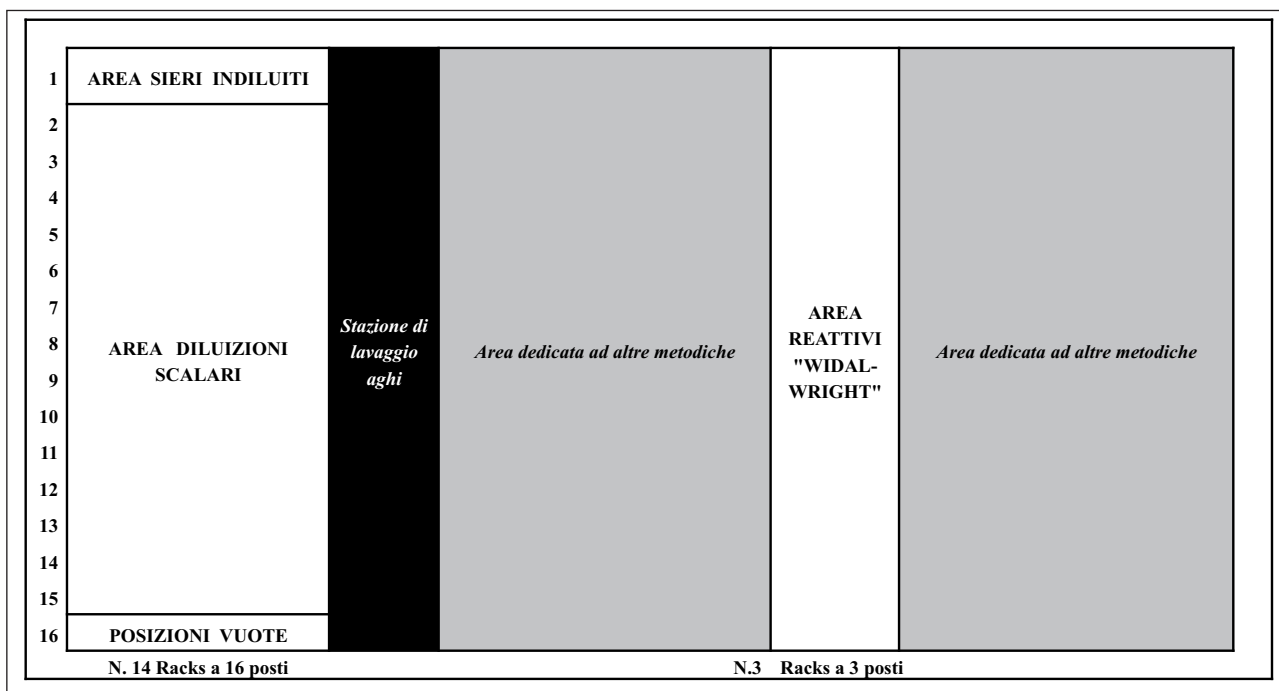


Fig. 1. Schema del Piano di lavoro di Freedom EVO Clinical 150.

Su ciascun rack a 16 posti, la posizione 1 era impegnata dal campione di siero indiluito, le seguenti erano occupate in sequenza dalle 2 diluizioni scalari (1:50 e 1:100) di ciascun antigene O ed H delle Salmonelle Typhi e Paratyphi A e B, mentre il terzultimo ed il penultimo posto era dedicato alle 2 diluizioni scalari (1:50 e 1:100) di Brucella spp.; l'ultima posizione era lasciata libera; vedi schema riportato in Figura 2.

Per l'esecuzione dei tests sono state utilizzate le Sospensioni diagnostiche colorate della ditta SPIN-REACT relative agli antigeni O ed H di S. typhi, S. Paratyphi A e B, ed agli antigeni di Brucella spp.

Il diluitore è stato programmato in tre fasi.

Nella prima fase, venivano aspirati per ciascun campione 210 µl di siero indiluito, posto nella prima posizione del rack a 16 posti, e successivamente ne venivano erogati alternativamente 20 µl e 10 µl, a partire dalla seconda posizione dello stesso rack.

Nella seconda fase venivano aggiunti in sequenza, dalla seconda posizione in poi ed utilizzando la stessa modalità di distribuzione, 480 µl e 490 µl di solu-

zione fisiologica, in modo da ottenere rispettivamente titoli di 1:25 ed 1:50.

Infine nella terza ed ultima fase venivano distribuiti per ogni coppia di diluizioni (1:25 ed 1:50) 500µl di ciascuna sospensione diagnostica specifica, in modo da ottenere titoli finali di 1:50 ed 1:100, così come illustrato nello schema riportato nella Figura 3.

1 FASE		2 FASE		3 FASE		Diluizioni Finali
Siero		Soluzione Fisiologica		Sospensioni Batteriche		
20µl	+	480µl	+	500µl S. Typhi	Ag O	1:50
10µl		490µl		500µl S. Typhi	Ag O	1:100
20µl	+	480µl	+	500µl S. Typhi	Ag H	1:50
10µl		490µl		500µl S. Typhi	Ag H	1:100
20µl	+	480µl	+	500µl S. Paratyphi A	Ag O	1:50
10µl		490µl		500µl S. Paratyphi A	Ag O	1:100
20µl	+	480µl	+	500µl S. Paratyphi A	Ag H	1:50
10µl		490µl		500µl S. Paratyphi A	Ag H	1:100
20µl	+	480µl	+	500µl S. Paratyphi B	Ag O	1:50
10µl		490µl		500µl S. Paratyphi B	Ag O	1:100
20µl	+	480µl	+	500µl S. Paratyphi B	Ag H	1:50
10µl		490µl		500µl S. Paratyphi B	Ag H	1:100
20µl	+	480µl	+	500µl Brucella spp.		1:50
10µl		490µl		500µl Brucella spp.		1:100

Fig. 3. Programmazione della sequenza di erogazione del Siero e dei Reattivi.

Siero 1	Siero 2	Siero 3	Siero 4	Siero 5	Siero 6	Siero 7	Siero 8	Siero 9	Siero 10	Siero 11	Siero 12	Siero 13	Siero 14
TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50	TO 1:50
TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100	TO 1:100
TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50	TH 1:50
TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100	TH 1:100
AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50	AO 1:50
AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100	AO 1:100
AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50	AH 1:50
AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100	AH 1:100
BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50	BO 1:50
BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100	BO 1:100
BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50	BH 1:50
BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100	BH 1:100
Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50	Bruc. 1:50
Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100	Bruc. 1:100
Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto	Posto vuoto
Rack 1	Rack 2	Rack 3	Rack 4	Rack 5	Rack 6	Rack 7	Rack 8	Rack 9	Rack 10	Rack 11	Rack 12	Rack 13	Rack 14

Fig. 2. Distribuzione delle Sospensioni Diagnostiche nell'Area dedicata ai 14 Racks a 16 posti.

Dopo la distribuzione, ciascun rack dedicato specificamente al singolo campione in esame, veniva incubato a 37°C per 24 ore. Ultimato il periodo di incubazione, poi, si procedeva alla lettura della sierodiagnosi secondo i criteri precedentemente enunciati nella introduzione.

Come precedentemente accennato, si è voluto preliminarmente saggiare l'affidabilità del diluitore nella erogazione di volumi così piccoli di campione.

Si è provveduto perciò a determinare la precisione di ciascuna diluizione (1:50 e 1:100) dopo dispensazione dei volumi di siero e di reattivo all'interno di ciascun rack, in modo da evidenziare il comportamento del singolo ago campionatore (*Precisione per linea di distribuzione*), e tra i vari racks, in modo da valutare invece l'andamento complessivo di tutti gli 8 aghi del diluitore (*Precisione globale*).

Per ottenere dei dati confrontabili e misurabili che simulassero il comportamento dei sieri alle varie diluizioni, si è ricorso alla misurazione spettrofotometrica delle densità ottiche di una soluzione colorata concentrata, utilizzata al posto dei campioni. Essa, dapprima opportunamente diluita con soluzione fisiologica, come da metodica, veniva successivamente portata a titoli finali di 1:50 e 1:100 con l'aggiunta di un eguale volume di soluzione fisiologica, in sostituzione delle singole sospensioni di germi, in modo da renderne possibile la lettura ottica finale allo spettrofotometro.

È stata utilizzata la Soluzione Colorante Blu per Enzygnost della ditta Siemens, composta dal Colorante Patent Blue V 80 in Tampone TRIS/HCl. Questa soluzione colorante infatti alle diluizioni saggiate mostra valori di assorbimento ottico ben apprezzabili, ed inoltre non lascia residui colorati sui puntali del diluitore che, dopo i normali lavaggi tra le varie fasi della distribuzione, risultano perfettamente puliti. La Soluzione Colorante Blu è stata frazionata in otto aliquote, in modo da poter sag-

giare contemporaneamente tutti gli otto puntali e le relative linee di distribuzione.

Per le letture ottiche si è utilizzato lo spettrofotometro Photoanalyzer Jolly 103 della ditta Crony Instruments tarato ad una lunghezza d'onda di 620 nm.

È stata valutata poi l'accuratezza delle diluizioni. Anche in questo caso si è ricorso al metodo della lettura ottica con lo spettrofotometro. Tuttavia, non avendo a disposizione uno standard noto, è stato necessario allestirne uno di riferimento. Si è utilizzata anche in questo caso la Soluzione Colorante Blu per Enzygnost, già precedentemente impiegata nelle prove di precisione. Tale colorante è stato diluito manualmente, in modo da ottenere due serie di 10 provette rispettivamente con titoli di 1:50 e di 1:100. Per ciascuna serie è stata eseguita una lettura spettrofotometrica a 620 nm e si è calcolata la media delle densità ottiche ottenute per ciascun titolo. Tale media è stata eletta a media di riferimento (*di consenso*), che è stata raffrontata con le corrispondenti medie ottenute dalle letture delle prove eseguite con il diluitore.

Infine, è stata valutata la concordanza tra i risultati ottenuti utilizzando la metodica "classica" a 7 diluizioni in manuale e quella "screening" a 2 diluizioni proposta dagli Autori in automazione. Le prove sono state effettuate in parallelo su 367 campioni di siero provenienti da pazienti pediatrici, pervenuti presso la nostra AORN "Santobono-Pausilipon", con sospetto di febbre tifoide o brucellosi, per un periodo di sei mesi ed utilizzando gli stessi reattivi.

Risultati

Precisione: I dati ottenuti, illustrati nelle **Tabella A** e **B**, mostrano una precisione molto elevata, sia *totale* che *per singola linea di distribuzione*, con CV% estremamente contenuti a tutte le diluizioni, i cui valori variano tra 1,875% e 3,299%, testimoniando l'alta affidabilità del diluitore anche con volumi di siero molto esigui (10 ul e 20 ul).

Tabella A PRECISIONE PER LINEA DI DISTRIBUZIONE									
<i>N=7</i>		Ago 1	Ago 2	Ago 3	Ago 4	Ago 5	Ago 6	Ago 7	Ago 8
Titolo 1:50	X	0,842	0,832	0,817	0,834	0,837	0,816	0,813	0,814
	DS	0,028	0,020	0,016	0,028	0,019	0,019	0,020	0,018
	CV%	3,325	2,397	1,957	3,299	2,222	2,291	2,519	2,224
Titolo 1:100	X	0,408	0,413	0,429	0,416	0,420	0,424	0,430	0,419
	DS	0,012	0,011	0,012	0,009	0,011	0,008	0,012	0,017
	CV%	2,941	2,581	2,851	2,130	2,629	1,875	2,754	3,039
Tabella B PRECISIONE TOTALE									
<i>N=56</i>		Titolo 1:50				Titolo 1:100			
X		0,826				0,420			
D.S.		0,021				0,011			
C.V. %		2,519				2,742			

Accuratezza: Anche l'accuratezza, sia totale che per singola linea di distribuzione, ai vari titoli è più che soddisfacente. Tuttavia, mentre l'accuratezza totale mostra valori di scostamento percentuale dalla media di consenso sovrapponibili, pari a -4,550 % per il titolo 1:50 ed a -5,022 % per il titolo 1:100, invece nelle prove relative a ciascuna linea di distribuzione le deviazioni percentuali delle medie sperimentali dalla media utilizzata come riferimento presentano valori più elevati, ma comunque ampiamente accettabili, come viene documentato nelle **Tabelle C e D**.

Concordanza tra metodi: La valutazione dei dati relativi alla concordanza dei risultati ottenuti nelle due modalità di esecuzione della sierodiagnosi ("classica" e "screening") è riportata nella **Tabella E**. In questa sono indicati il numero di campioni con esito negativo ed il numero di quelli con esito positivo all'indagine sierologica. La concordanza diagnostica tra i valori finali refertati con le due metodiche è stata del 100%, senza nessuna differenza, né quan-

titativa, limitatamente ai titoli 1:50 ed 1:100, né qualitativa, relativamente all'impiego delle singole sospensioni batteriche.

Conclusioni

Dai dati ottenuti si evince che il metodo di screening proposto risulta perfettamente sovrapponibile nei risultati finali a quello classico, mostrando una concordanza diagnostica assoluta.

Esso presenta diversi vantaggi:

1. Non penalizza la tempestività della diagnosi, che può essere perfezionata, in caso di positività, nelle successive 24 ore, senza la necessità di effettuare un ulteriore prelievo al paziente.
2. Garantisce risultati finali estremamente affidabili grazie alla elevata precisione ed accuratezza nelle distribuzioni di siero e di reattivi effettuate in automazione a tutte le diluizioni.
3. Viene eseguito, automatizzando le fasi di titolazione, in minor tempo e senza dover richiedere necessariamente la supervisione di personale di labora-

Tabella C		ACCURATEZZA PER LINEA DI DISTRIBUZIONE							
<i>N=7</i>		Ago 1	Ago 2	Ago 3	Ago 4	Ago 5	Ago 6	Ago 7	Ago 8
TITOLO 1:50	Media di riferimento	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865
	Media sperimentale	0,842	0,832	0,817	0,834	0,837	0,816	0,813	0,814
	Deviazione %	-2,626	-3,865	-5,582	-3,633	-3,204	-5,648	-5,979	-5,863
TITOLO 1:100	Media di riferimento	0,442	0,442	0,442	0,442	0,442	0,442	0,442	0,442
	Media sperimentale	0,408	0,413	0,429	0,416	0,420	0,424	0,430	0,419
	Deviazione %	-7,692	-6,561	-3,038	-5,915	-5,010	-4,105	-2,747	-5,107

Tabella D			ACCURATEZZA TOTALE
<i>N=56</i>			
		TITOLO 1:50	TITOLO 1:100
Media di riferimento		0,865	0,442
Media sperimentale		0,826	0,420
Deviazione %		-4,550	-5,022

Tabella E				CONCORDANZA DEI RISULTATI
<i>N=367</i>		Metodica Manuale Classica	Metodica Automatizzata Screening	CONCORDANZA (%)
Campioni NEGATIVI		363	363	100
Campioni POSITIVI		4	4	100

torio, che può essere recuperato per espletare altri compiti.

4. Infine, trattandosi di un metodo di screening che impiega solo 2 diluizioni del campione in esame, risulta particolarmente vantaggioso economicamente, assicurando un notevole risparmio di reagenti.

Bibliografia

Bradley D Jones. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:533-61.
Coulter JBS. Current Pediatrics 1996; 6:25-29.
David A et al. Current Opinion in Infectious Diseases. 1994; 7:616-23.
De Lalla F, Orlando G, Pellizzer GP, Manfrin V. In: Moroni M: *Malattie Infettive 6a ed* 2004; 466-78.
De Lalla F, Rizzardini G, Orlando G. In: Moroni M: *Malattie Infettive 6a ed* 2004;714-7.
Edward J Young. An overview of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 21:283-90.
Lateef A Olopoenia e Aprileona L King: Widal agglutination test - 100 years later: still plagued by controversy, *Postgrad Med J* 2000;76:80-4.
Ley B et al. Evaluation of the Widal tube agglutination test for the diagnosis of typhoid fever

among children admitted to a rural hospital in Tanzania and a comparison with previous studies, *BMC Infect Dis* 2010; 10:180.

Nicoletti P. In: Pasquinelli F: *Diagnostica e Tecnica di Laboratorio* 1981; 2, 319.

Taiwo SS, Fadiora SO, Oparinde DP, Olowe OA.: Widal agglutination titres in the diagnosis of typhoid fever. *West Afr J Med*. 2007 Apr-Jun;26(2):97-101.

Washington JA II. In: Henry JB, ed, *Medical microbiology in clinical diagnosis and management by laboratory method* 18th edn 1991; 1055-58.

Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1991;13: 359-372.

Zagami F, Esposito C, Sciacca V, Donadio P, Tarro G. La Brucellosi: Aspetti diagnostici di laboratorio, *Rass Int Clin Terap* 1988; 68(16):942-8.

Ringraziamenti

Si ringraziano il Dott. Antonio Giacca (ditta Siemens) ed il Dott. Nicola Pece (ditta TECAN) per la preziosa collaborazione non condizionante.

Pervenuto il 7/11/2013

IPOTIROIDISMO IN GRAVIDANZA IN DONNE RESIDENTI IN UNA VALLE APPENNINICA

¹GIULIO OZZOLA, ¹LUCIA GASBARRI, ²CARLO MONTAINI

¹U.O. Laboratorio Analisi ASL8- Arezzo

²Zona Distretto Casentino ASL8-Arezzo

Riassunto

La prevalenza dell'ipotiroidismo negli adulti italiani è intorno al 10%. Si stima che in gravidanza la prevalenza dell'ipotiroidismo sia intorno al 3%. Questa patologia può comportare in gravidanza varie complicanze sia a carico della gestante che del nascituro. In questo lavoro si è misurato il TSH a 708 donne, tutte residenti nella stessa valle appenninica, al primo trimestre di gravidanza. Si è potuto così evidenziare che quasi il 20% di queste donne era già ipotiroidica nota ed in terapia. Inoltre, la mediana del TSH del primo trimestre di gravidanza nelle donne eutiroidiche e che non hanno avuto complicanze gravidiche è confrontabile con i valori riscontrati in letteratura. Infine si è rilevato che le complicanze attribuibili ad ipotiroidismo in donne ipotiroidiche ed in terapia sono in percentuale lievemente inferiore rispetto alla popolazione generale e questo dato potrebbe confermare che, se fatta e monitorata bene, la terapia sostitutiva aiuta a prevenire le complicanze della gravidanza.

Abstract

The prevalence of hypothyroidism is about 10% of Italian adults. It is estimated that the prevalence of hypothyroidism in pregnancy is around 3%. This disease can result in various complications of pregnancy, causing problems to the mother and the fetus. In this work we measured the TSH levels in 708 women, all residents in the same Appennines valley and in the first trimester of pregnancy. Thus, it has been noted that almost 20% of these women had an already known hypothyroidism and were in hypothyroid therapy, and that the median TSH values in euthyroid women in the first trimester of pregnancy, with no gravidic complications, are comparable to the values found in literature. Finally, it was found that complications attributable to hypothyroidism in women with hypothyroidism but in therapy, are in lower percentage than the general population and this fact could confirm that, if well done and followed up, thyroid hormonal replacement therapy helps to prevent complications of pregnancy.

Introduzione

L'ipotiroidismo è una condizione morbosa caratterizzata da un rallentamento generale delle funzioni metaboliche per insufficiente azione degli ormoni tiroidei sui tessuti. Nella maggior parte dei casi è dovuto a deficit di produzione ormonale da parte della tiroide e solo raramente è conseguenza di un ridotto effetto degli ormoni tiroidei sui tessuti periferici.

La prevalenza dell'ipotiroidismo negli adulti italiani è intorno al 10% della popolazione, maggiore se si considera quella femminile (Andreoli et al, 2010; Agenzia Sanitaria Servizi Regionali, 2005). Tra le varie casistiche riscontrabili in letteratura vi è una discreta variabilità della prevalenza dell'ipotiroidismo

in quanto questa dipende da vari fattori, quali i metodi di dosaggio usati ed il loro cut-off, l'età della popolazione esaminata, il sesso, la zona geografica e l'apporto iodico giornaliero. L'ipotiroidismo può essere distinto in conclamato o subclinico. Quest'ultimo è caratterizzato da valori di tireotropina sierica (TSH) più alti dei suoi limiti superiori previsti ma con livelli normali di tiroxina libera (fT4), invece nell'ipotiroidismo franco si riscontrano alti livelli di TSH, in genere sopra i 10 mU/l, associati a bassi valori di fT4 (Garber et al, 2012).

In gravidanza la prevalenza dell'ipotiroidismo è inferiore a quella riscontrata nella popolazione generale perché l'ipotiroidismo è già di per sé causa di infertilità e perché è una patologia che aumenta con l'aumentare dell'età (Krassas et al, 1999). Si stima che la prevalenza dell'ipotiroidismo franco in gravidanza sia dello 0,3-0,5% mentre la forma subclinica si aggira tra il 2 ed il 3% (Klubo et al, 2011). Va sottolineato che la gravidanza ha un forte impatto sulla tiroide comportando molte variazioni sulla sua funzionalità. Infatti già dopo poche settimane dal concepimento la proteina legante la tiroxina incrementa di 2-3 volte e ciò porta ad un successivo aumento degli ormoni tiroidei. Inoltre, nel primo trimestre l'aumento della gonadotropina corionica, che ha un effetto tireostimolante, causa una caduta dei livelli sierici di TSH ed un aumento della produzione di ormoni tiroidei. Infine, in gravidanza si ha anche la necessità di una aumentata assunzione materna di iodio sia per la sua aumentata clearance renale che per i bisogni ormonosintetici del feto (Toffalori et al, 2010).

Le malattie della tiroide sono una delle più frequenti cause di complicazioni in gravidanza tanto che si calcola che inducano circa il 2% dei problemi insorti durante la gestazione (Lazarus, 2002). Un ipotiroidismo franco e non trattato in gravidanza può

comportare differenti e numerose complicanze; tra queste vi sono aborti spontanei, parto pretermine, preeclampsia, ipertensione materna, emorragie postpartum, basso peso alla nascita, difficoltà motorie e neurologiche del neonato (Glinioer et al, 1991). Nel 2011 è stato dimostrato che il trattamento con L-tiroxina prima del concepimento riduce le complicanze in donne con ipotiroidismo subclinico seguite per riproduzione assistita (Kim et al, 2011). Si è quindi introdotto un ampio dibattito sull'efficacia del trattamento con L-tiroxina in gravidanza nei confronti delle complicanze materne e fetali. Nel 2006 è stata dimostrata una significativa riduzione degli aborti e dei parti prematuri in donne con anticorpi antitiroidee trattate con levotiroxina (Negro et al, 2007) e successivamente sono state create numerose linee guida sul monitoraggio ed il trattamento delle donne ipotiroidiche in gravidanza (Cassio et al, 2007). Queste linee guida sono tutte accomunate dal sottolineare la necessità di una anamnesi pre-concezionale su eventuali patologie tiroidee preesistenti e dalla utilità diagnostica e/o di monitoraggio terapeutico di alcuni dosaggi sierici che comprendono sempre il TSH.

Il Casentino è una valle appenninica toscana (AR) circondata per tre lati da montagne che potrebbe essere a moderata/lieve carenza iodica (Ozzola et al, 2008). Quindi nella popolazione in genere, ma soprattutto nelle donne in gravidanza, si potrebbe riscontrare una discrepanza tra apporto iodico ed esigenze ormonosintetiche materne. Con questo lavoro si vuole evidenziare qual è la prevalenza dell'ipotiroidismo nelle donne gravide casentinesi, qual è la mediana del TSH nelle donne eutiroidee nel primo trimestre di gravidanza e con decorso gravidico fisiologico e, infine, l'efficacia della terapia sostitutiva con L-tiroxina nelle ipotiroidiche note.

Materiali e metodi

Sono state arruolate 708 donne al primo trimestre di gravidanza. Tutte sono residenti in Casentino. Al momento del reclutamento a tutte è stato chiesto se soffrissero di ipotiroidismo e se facessero terapia sostitutiva con L-tiroxina. Al primo prelievo ematico previsto come controllo della gravidanza dalla regione toscana nel primo trimestre veniva aggiunta, previa firma del consenso informato, la determinazione del TSH. La misurazione di questo ormone è stata fatta su siero prelevato nel primo trimestre di gravidanza, utilizzando sistema Cobas Elecsys 600e. Al termine della gravidanza è stata riempita una scheda sul decorso gravidico ed in particolare sulla eventuale insorgenza di complicazioni attribuibili ad ipotiroidismo. Le complicanze considerate sono: aborto, minaccia di aborto, minaccia di parto prematuro, ipertensione gravidica, diabete gestazionale, polidramnios, oligodramnios, gravidanza protratta, scarsa crescita fetale, CGT di allarme.

Risultati

Le donne avevano una età media di a. 31,4 +/- 3. Quelle che erano già ipotiroidiche note ed in terapia erano 139 (19,6%). Le complicanze attribuibili ad ipotiroidismo sono comparse in 68 gravide (9,6% della popolazione totale) di cui 11 in terapia sostitutiva (7,9% su 139) e 57 non ipotiroidiche (9,8% su 577). La mediana dei valori di TSH riscontrati è riassunta in Tab.1. Le complicanze comparse sono state: minaccia di aborto 7, minaccia di parto prematuro 4, ipertensione gravidica 12, diabete gestazionale 12, poli/oligodramnios 5, gravidanza protratta 1, scarsa crescita fetale 5, CGT di allarme 19. Di tutta la casistica 28 donne avevano al controllo del primo trimestre un TSH maggiore di 5 mUI/L. Tutte queste donne erano già ipotiroidiche note ed in terapia; di queste ben 5 (18%) sono andate incontro a complicanze. Le donne che al primo trimestre avevano valori di TSH inferiori a 2,5 mUI/L erano 118, di queste 8 erano ipotiroidiche note ed in terapia. In questo gruppo le complicanze imputabili ad ipotiroidismo sono state 12 (10%).

	n°	TSH	I.C.
Donne arruolate	708	1,35	0,45-5,55
Gravidanze complicate	68 (9,6%)	1,09	1,44-6,00
Gravidanze non complicate	638 (90,4%)	1,36	1,01-4,73
Ipotiroidiche in terapia	139 (19,6%)	2,91	1,96-4,10
Gravidanze non ipotiroidiche e prive di complicanze	519 (73,3%)	1,27	0,99-4,53

Tab. 1. Mediana dei valori di TSH (mUI/l) riscontrati e I.C. (95 % - 5%).

Discussione

Il dato più eclatante riscontrato in questo lavoro è quello che nella popolazione esaminata ben il 19,6% delle donne erano ipotiroidiche note. Come già detto in Italia si stima che la prevalenza dell'ipotiroidismo nella popolazione adulta sia del 10% e quindi il valore da noi riscontrato, che inoltre si riferisce a donne giovani, è certamente molto elevato. L'unica ipotesi per spiegare ciò si potrebbe trovare in studi effettuati nella popolazione del Casentino e che dimostrano come nella popolazione in genere, e nelle donne in gravidanza in particolare, i livelli di ioduria siano bassi (Ozzola et al, 2011; Montaini et al, 2013) e questo certamente può aver rappresentato uno stimolo gozzigeno protratto negli anni.

Anche le complicanze attribuibili ad ipotiroidismo sono percentualmente elevate e ciò sia nelle ipotiroidiche note che in quelle non ipotiroidiche. È comun-

que evidente che tale incidenza (18%) sia particolarmente elevata nelle donne con valori di TSH all'inizio della gravidanza maggiori di 5 mUI/L. Un limite di questo lavoro è che per il TSH si riferisce al solo prelievo del primo trimestre e non è noto se e di quanto la terapia sia stata successivamente aumentata. Le complicanze attribuibili ad ipotiroidismo in donne ipotiroidiche ed in terapia sono in percentuale inferiore rispetto alla popolazione generale e questo dato potrebbe confermare che, se fatta e monitorata bene, la terapia sostitutiva aiuta a prevenire le complicanze della gravidanza.

Le mediane dei valori di TSH riscontrati e riassunti in Tab.1 indicano dei valori simili tra i vari gruppi fatta eccezione di quelle ipotiroidiche in terapia in cui il TSH è decisamente più elevato. Questo dato comunque non sorprende in quanto è ben noto in letteratura, e più Autori hanno segnalato, che all'inizio della gravidanza o addirittura già in fase preconcezionale i dosaggi di L-tiroxina devono essere aumentati notevolmente (Mandell et al, 1990). Anche le mediane del TSH tra gravidanze complicate e gravidanze non complicate sono tra loro simili anche se è da notare che gli Intervalli di Confidenza (I.C.) delle gravidanze complicate sono decisamente più elevati.

Il TSH del gruppo di donne che non risultava ipotiroidico e non ha avuto complicanze potrebbe essere assunto come Intervallo di Riferimento del TSH nelle donne casentinesi al primo trimestre di gravidanza. In effetti la casistica è numerosa ma, per soddisfare i requisiti previsti dalla NCCLS manca la determinazione degli anticorpi anti TPO (NCCLS, 2000). Nonostante ciò la mediana e gli I.C. riscontrati in questo lavoro sono confrontabili con quelli da noi evidenziati, sempre nella popolazione casentinese al primo trimestre di gravidanza, con uguale tecnologia ma altri metodi statistici (Dorizzi et al, 2010; Ozzola et al, 2013). I valori da noi ottenuti sono confrontabili anche con quelli resi noti dalla Ditta Roche ottenuti in una casistica ampia e dopo valutazione rigorosa dei metodi statistici (Roche, 2009). Considerato che ormai molti Autori (Abalovich et al., 2007) consigliano ad ogni laboratorio di avere i propri I.R. per gli ormoni tiroidei in gravidanza, per il Casentino potrebbero essere utilizzati nel primo trimestre quelli indicati in questo studio che seppure con tanti limiti, certamente sono più adatti di quelli normalmente usati per la popolazione in toto.

Bibliografia

Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot LJ, Glinoe D, Mandel SJ, Stagnaro A. Management of Thyroid Dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 59:320-327.
Andreoli M, Centenni M. L'ipotiroidismo: attualità

cliniche, fisiopatologiche e terapeutiche. *Rec Progr Med* 1991; 82, 344-351.

Agenzia Sanitaria per I Servizi Regionali. Tiroide e gravidanza. Linee Guida Nazionali di Riferimento, 2005. <http://www.agenas.it> (data di consultazione: 28.3.10).

Cassio A, Chiovato L, Cicognani A, Dorizzi RM, Garofano P, Gennazzani AR, Glinoe D, Negro R, Papini E, Petraglia F, Pinchera A, Tonacchera M, Toscano V, Valensise H, Zini M. Gestione clinica della gravida con ipotiroidismo: le azioni. *RIMel/IJLM* 2007; 3: 230-231.

Dorizzi RM, Ozzola G, Sommella C, Catania F, Lelli F, Migali E, Polverini G. An Approach to establish reference intervals for Thyrotropin in pregnancy using the ADVIA Centaur Analyzer. *Clin Lab* 2010; 56(9-10): 417-25.

Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey Jv, Klein I, Mechanik JI, Pollack RP, Singer PA, Woebler KA. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Thyroid* 2012; 12: 1200-1235.

Glinoe D, Soto MF, Bordoux P, Lejeune B, Delange F, Lemone M, Robijn C, Grun GP, de Nayer P. Pregnancy in patients with mild thyroid abnormalities: maternal and neonatal repercussions. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:421-427.

Kim CH, Ahn JW, Kang SP, Kim SH, Chae HD, Kang BM. Effect of levothyrosin treatment on in vitro fertilization and pregnancy outcome in infertile women with subclinical hypothyroidism undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2011; 95: 1650-1654.

Krassas GE, Pontidikes N, Kaltsas T, Papadopoulos P, Paunkovic J. Disturbances of menstruation in hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 1999; 50, 655-659.
Klubo-Gwiezdzinska J, Burmann KD, Van Nostrand D, Wartofsky L. Levotiroxine treatment in pregnancy: indications, efficacy, and therapeutic regimen. *J Thyroid Res* 2011; 8 1-21.

Lazarus JH. Epidemiology and prevention of thyroid disease in pregnancy. *Thyroid* 2002; 12: 861-865.

Mandell SJ, Larsen PR, Seely EW. Increased need for thyroxine during pregnancy in women with primary hypothyroidism. *N Engl J Med* 1990; 323: 91-96.

Montaini C, Giglio E, Silvano A, Gasbarri L, Ozzola G. La ioduria in una valle appenninica toscana. *Il Cesalpino* 2012; 34:20-22.

Negro R, Formoso G, Manigieri T, Pezzarossa A, Dazzi D, Hassan H. Levotiroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 91: 2578-2591.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. NCCLS document C28-A2 Wayne, PA: NCCLS 2000; 20:13.

Ozzola G, Migali E, Montaini C, Randellini D, Silvano A. Gli intervalli di riferimento degli ormoni tiroidei in gravidanza Torino 2013 Atti 27° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina di Laboratorio p. 628.

Ozzola G, Morello F, Gervino S, Polverini G, De Prizio M, Sommella C. Studio preliminare sulla ioduria in Casentino. *Il Cesalpino* 2008; 19: 5-6.

Roche Reference intervals for children and adults. *Elecsys Thyroid tests*. 2009 Roche.

Toffalori E, Caciagli P. Tiroide e gravidanza. *RIMel/JLaM* 2010; 6: 115-120.

corrispondenza:
g.ozzola@usl8.toscana.it

Pervenuto il 30/10/2013

VITAMINA D: CONTRIBUTO ALLA VALUTAZIONE DELLO STATUS VITAMINICO IN UN CAMPIONE DI POPOLAZIONE SANA DEL NORD EST DELL'ITALIA

¹UGO QUALIZZA, ¹GIUSEPPE BARBINA, ¹ANTONIO COLATUTTO, ²FABIO VENTURELLI, ¹MARCELLA ORZAN,
¹ELIO TONUTTI, ¹PIERGUIDO SALA, ¹FRANCESCO CURCIO

¹DPT di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia – Udine

²DPT di Diagnostica Area Vasta di Medicina Trasfusionale,

Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia – Udine

Riassunto

Da diversi anni è noto il ruolo che la Vitamina D ha nel regolare i livelli circolanti di Calcio e Fosforo per assicurare un normale stato di mineralizzazione ossea. Attualmente diversi studi hanno dimostrato come livelli insufficienti di Vitamina D siano correlati con un elevato rischio di patologie extrascheletriche: malattie cardiovascolari, cancro, ipertensione arteriosa, diabete, sclerosi multipla, malattie infettive, ecc.

Recenti indagini condotte sia in Europa che in Nordamerica hanno evidenziato diffuse carenze di tale vitamina soprattutto in età geriatrica ma anche nella popolazione adulta apparentemente in buono stato di salute.

Nel presente studio si sono determinate le concentrazioni di Vit D 25OH e Paratormone in 190 campioni di siero di soggetti esenti da patologie note, con lo scopo di valutare la distribuzione di tali metaboliti in una popolazione dell'hinterland udinese a 45.6° di latitudine Nord in relazione ai recenti livelli di normalità proposti dalla letteratura internazionale.

Abstract

Vitamin D status investigation in North East healthy population.

The pivotal role of Vitamin D status has been recently defined in calcium and phosphate blood levels regulation as to ensure a normal bone mineralization. There is strong evidence that low Vitamin D levels are thoroughly related to increased risk of Cancer, Arterial Hypertension, Diabetes Mellitus, Multiple Sclerosis, Cardiovascular and Infectious Diseases.

Recent surveys have shown Vitamin D very low levels not only in geriatric population but also in adult and seemingly healthy people.

In our study analysis and comparison of Vitamin D and PTH concentrations were performed on 190 serum samples from apparently healthy outpatients, as to study statistical distribution of Vitamin D and PTH, in a North East (45.6° Latitude North) healthy population, according to the proposals.

Introduzione

Negli ultimi anni, oltre ad essersi verificato un incremento oggettivo delle conoscenze sull'effettivo ruolo della Vitamina D nel metabolismo osseo, vi è stata altresì una consensuale consapevolezza, da parte degli addetti ai lavori, dell'importanza di questa vitamina anche in una serie di patologie in apparenza non direttamente correlate al metabolismo fosfocalcico.

La vitamina D viene oggi considerata un sistema ormonale complesso, coinvolto non solo nella regolazione degli ioni calcio e dell'osso, ma anche nella proliferazione e differenziazione di numerosi tipi cel-

lulari con un potenziale ruolo in numerose patologie. Diversi studi dimostrano che deficit di tale vitamina sono correlati con patologie cardiovascolari, pneumopatie acute e croniche (Ginde et al, 2009), deficit cognitivi (Lee et al, 2009), insorgenza di neoplasie, di malattie autoimmuni ed anche di tubercolosi polmonare (Wallis et al, 2008; Lappe et al, 2007). A conferma di una funzione extra ossea della Vitamina D vi è pure la recente scoperta di specifici recettori vitaminici (VDR) in vari organi ed apparati (De Luca, 2004). Si è inoltre osservato che coloro che vivono a latitudini più elevate hanno un maggiore rischio di sviluppare malattie neoplastiche. In questi soggetti infatti la produzione di Vitamina D è ridotta: è stato quindi ipotizzato che esista un'associazione tra la deficienza di Vitamina D e lo sviluppo di neoplasie. Adulti con livelli di Vit. D 25 OH inferiori a 50 nmol/L hanno un aumentato rischio (di circa il 30-50%) di insorgenza di carcinomi alla mammella, al colon retto, alla prostata ed ad altri organi. Soggetti che assumono più di 400 IU di Vit. D al giorno hanno un marcato decremento del rischio di sviluppo di tumori, compresi quelli localizzati al pancreas, all'esofago, e di malattie di tipo ematologico come i linfomi non Hodgkin (Holick, 2006).

Considerazioni analoghe possono essere fatte anche per patologie quali diabete, sclerosi multipla, morbo di Crohn ed ipertensione (Stene et al, 2000; Rostand, 1979). Soggetti ai quali sono state somministrate giornalmente 2000 IU di Vit. D durante i primi anni di vita, seguiti poi per ben 31 anni, hanno avuto un rischio ridotto del 78% di sviluppare diabete di tipo 1° (Hypponen, 2001). Donne che hanno ricevuto più di 400 IU di Vit. D al giorno hanno dimostrato avere

un ridotto rischio di sviluppare sclerosi multipla ed artrite reumatoide (Munger et al, 2004; Merlino et al, 2004).

Studi condotti su pazienti ipertesi, sottoposti a radiazioni ultraviolette, con conseguente innalzamento del 180% dei loro livelli ematici di Vit. D, sono diventati in tre mesi normotesi (Krause et al, 1998).

Inoltre soggetti che vivono ad alte latitudini, con ridotti livelli di Vit. D, sviluppano più facilmente schizofrenia e depressione (McGrath et al, 2002; Gloth et al, 1999).

Bassi livelli di Vitamina D sono anche stati associati ad un aumentato rischio di preeclampsia (Bodnar et al, 2007).

Da questi dati appare importante stabilire quali siano i corretti livelli di Vitamina D nel sangue misurando la Vit. D 25 OH che è il miglior indicatore per valutarne lo status nell'organismo. Tutto ciò allo scopo di prevenire non solo patologie ossee, ma anche malattie che coinvolgono altri organi ed apparati. Ormai è opinione comune che i valori ottimali di Vit. D 25 OH debbano essere compresi fra 70-80 nmol/L (Dawson-Hughes et al, 2005). Attualmente, da dati provenienti dalla letteratura, appare che larghe fasce di popolazione sono a rischio di carenza vitaminica. Si stima che 1 miliardo di persone non possiedano la concentrazione minima ottimale di 70 nmol/L (Holick, 2006).

Un ulteriore aspetto che riveste particolare interesse è quello che coinvolge i quadri carenziali, più o meno larvati o manifesti, non solo nell'anziano ma anche nel sesso femminile e nell'adulto in genere.

Nel presente lavoro sono stati processati 190 campioni di siero di soggetti senza patologia manifesta per determinarne la concentrazione di 25 OH Vitamina D e Paratormone, allo scopo di valutare la distribuzione di tali analiti in un campione di popolazione residente a 45.6° latitudine Nord.

Materiali e metodi

Sono stati dosati la 25-Idrossivitamina D (Vit. D 25OH) serica ed il Paratormone (PTH) in un campione di 190 soggetti estratti da una popolazione afferente al Centro Prelievi annesso al Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio dell' Azienda Ospedaliero - Universitaria S. Maria della Misericordia in Udine.

I criteri di ammissione allo studio sono stati i seguenti: assoluta assenza di patologia evidenziabile sia dal punto di vista clinico - anamnestico che dal punto di vista laboratoristico e provenienza "dall'hinterland udinese" a 46.5° di latitudine Nord.

I sieri sono stati raccolti nel periodo Gennaio - Dicembre, congelati a -80°C e quindi sgelati in 3 lotti ed immediatamente processati.

La Vit. D è stata dosata con metodica immunologica diretta competitiva a rivelazione chemiluminescente (Chemi Luminescent Immuno Assay, CLIA) utilizzando un kit della ditta DiaSorin (DiaSorin S.p.A. Via

Crescentino snc 13040 Saluggia VC- Italy). La metodica, completamente automatizzata su strumentazione Liaison, (DiaSorin), prevede una prima fase di incubazione durante la quale la Vit. D 25OH, dissociata dalla sua proteina di trasporto, compete con l'analogo metabolita marcato con un derivato dell'isoluminolo per un numero ridotto di siti anticorpali legati alla fase solida. In seguito vi è una seconda incubazione con la rimozione del materiale non legato e, tramite opportuni lavaggi, vengono aggiunti gli starter che innescano una reazione chemiluminescente tipo "flash" con emissione fotonica inversamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione. La concentrazione è quindi ottenuta confrontando tale emissione con quella di una curva standard precedentemente memorizzata dal sistema. Gli intervalli di misura dichiarati dalla Ditta sono compresi tra 10 e 375 nmol/L mentre la metodica presenta un C.V. totale da noi calcolato di 14.2%.

Parallelamente al dosaggio della Vitamina D 25OH è stata determinata la concentrazione dell'ormone Paratiroideo (PTH) nei sieri campione con metodica Siemens su Immulite 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostic, 5210 Pacific Concourse Drive, Los Angeles, CA 90045-6900 USA). Tale metodica, in completa automazione, è strutturata come un dosaggio immunometrico sequenziale a due siti con rilevazione chemiluminescente e dosa il PTH molecola intatta. Gli intervalli di misura dichiarati dalla ditta Siemens relativamente al Paratormone per il Kit utilizzato vanno da 3.0 a 2500 pg/mL, mentre il C.V. totale dichiarato è del 9%. Gli intervalli di normalità adottati dal nostro Laboratorio per la Vit.D 25OH e per il Paratormone sono quelli attualmente suggeriti dalle Ditte produttrici dei rispettivi reagenti.

Si precisa che per questo studio è stata rispettata ed applicata la Dichiarazione relativa al protocollo di Helsinki del 1975.

Risultati

Il nostro campione è costituito da 190 soggetti di cui 149 (78.4%) maschi e 41 (21.6%) femmine con un'età media di 43.3 ± 11 anni ed una distribuzione che va da 19 a 70 anni. In figura 1 è riportata la frequen-

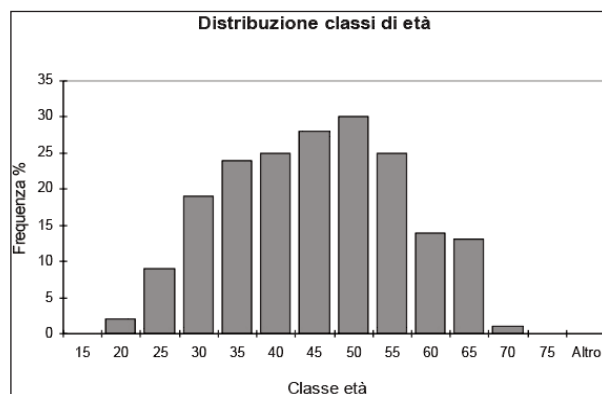


Fig. 1. Frequenza della distribuzione per età del campione studiato.

za della distribuzione ad istogrammi delle classi di età considerate.

Una prima analisi dei dati relativi alla Vit. D 25 OH rivela un intervallo di concentrazione che va da 8.0 a 162.0 nmol/L con una mediana di 60.8 nmol/L, mentre l'intervallo osservato dal 2.5° al 97.5° percentile è compreso tra 21.5 e 150 nmol/L.

In figura 2 è riportata la distribuzione delle concentrazioni di Vit. D 25 OH nel campione analizzato.

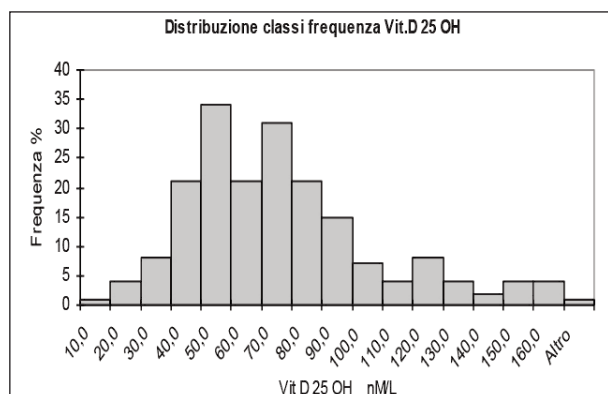


Fig. 2. Distribuzione delle concentrazioni di Vit D 25 OH nella popolazione in esame.

Parallelamente è stato condotto uno studio sui medesimi pazienti con lo scopo di valutare il valore di normalità del Paratormone nella popolazione dell'hinterland udinese. L'analisi statistica relativa a questo parametro ha rivelato una concentrazione media di PTH di 42.6 pg/mL ed il 95% dei soggetti aveva una concentrazione compresa tra 16.3 e 88.0 pg/mL (figura 3).

Nella nostra casistica abbiamo osservato la correlazione inversa tra i due parametri come già riportato dalla letteratura (figura 4). Si è evidenziata anche una debole correlazione inversa tra concentrazione

di Vit. D 25 OH ed età che non è risultata statisticamente significativa. Per difficoltà nel reclutamento dei pazienti non è stata valutata l'eventuale differenza stagionale nelle concentrazioni di vitamina D; è comunque nostra intenzione completare in tal senso questo studio. In tabella 1 è riportata l'analisi statistica riassuntiva relativa ai parametri analizzati sulla popolazione studiata.

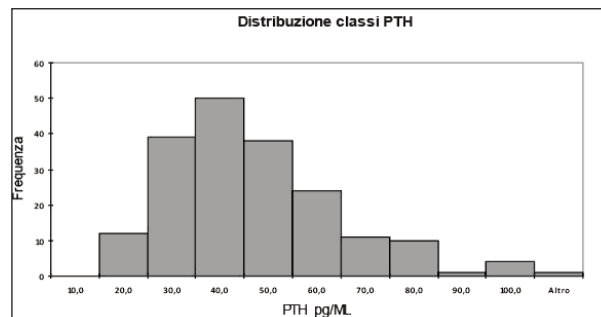


Fig. 3. Distribuzione delle concentrazioni di PTH nella popolazione in esame.

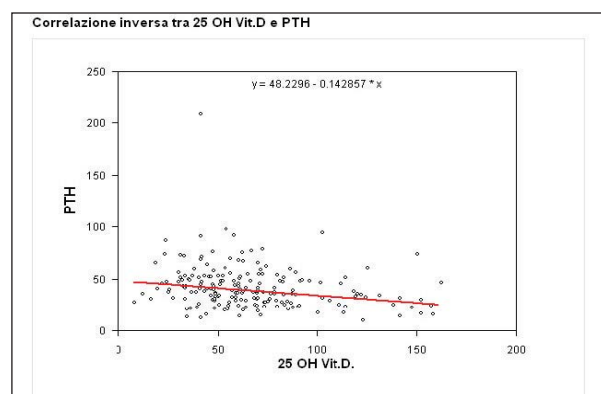


Fig. 4. Correlazione inversa osservata tra concentrazione di Vit D 25 OH (nmol/L) e concentrazione di Paratormone (pg/mL)

Vit D		PTH		ETÀ	
Media	66,67	Media	42,68368	Media	43,31053
Errore standard	2,310036	Errore standard	1,531646	Errore standard	0,821845
Mediana	60,85	Mediana	39,2	Mediana	44
Moda	47,5	Moda	37,4	Moda	39
Deviazione standard	31,84165	Deviazione standard	21,11228	Deviazione standard	11,32836
		Varianza campionaria	445,7286	Varianza campionaria	128,3316
Curtosi	0,746762	Curtosi	19,62081	Curtosi	-0,64856
Asimmetria	0,970173	Asimmetria	3,004528	Asimmetria	-0,03231
Intervallo	154	Intervallo	198	Intervallo	51
Minimo	8	Minimo	11	Minimo	19
Massimo	162	Massimo	209	Massimo	70
Conteggio	190	Conteggio	190	Conteggio	190

Tabella 1. "Analisi riassuntiva dei dati raccolti".

Discussione

Dai nostri dati si evince che l'intervallo di normalità statistico-matematica calcolato sulla nostra popolazione si colloca tra 21.5 e 150 nmol/L discostandosi lievemente da quello calcolato e consigliato dal produttore del kit in uso presso il nostro Laboratorio (12-132 nmol/L). A tal proposito è necessario riportare gli intervalli che, secondo la recente letteratura internazionale, permettono di classificare lo stato di concentrazione nella popolazione sana o apparentemente sana e che sono evidenziati in tabella 2 (Holick, 2007). Pur nella consapevolezza che non esiste ancora un consenso generale circa i livelli "ottimali" di Vitamina D si può ragionevolmente dedurre che tale livello si collochi intorno ai 75 -100 nmol/L (Holick, 2006). I nostri dati confermano in ogni caso la presenza, nel campione da noi valutato, di significative percentuali di carenza subclinica di Vit. D 25 OH come peraltro evidenziato da molti studi in differenti paesi ed in particolare nei periodi invernali. Se poniamo infatti il limite inferiore di "valore ottimale" consigliato a 75 nmol/L, il 68% dei nostri pazienti si troverebbe in un evidente stato di insufficiente apporto vitaminico. Nell'ipotesi di un cut-off intorno alle 50 nmol/L tale percentuale scenderebbe al 35.4%. D'altro canto si può notare che una percentuale intorno al 5.8 % di pazienti (11 su 190) verrebbe classificata, secondo la tabella n°2, come carente, presentando un concentrazione di Vit. D 25OH inferiore a 25 nmol/L.

Stato della VitD 25 OH	Concentrazione di VitD 25 OH nM/L
Deficienza	<25
Insufficienza	25-50
Livelli sufficienti	50-75
Livelli ottimali	>75

Tabella 2. "Livelli decisionali attualmente suggeriti per la Vit D25 OH".

In conclusione, pur considerando i limiti che il nostro studio può presentare (mancata valutazione della stagionalità, limitata numerosità campionaria, eventuali limiti nel reclutamento di soggetti presumibilmente sani ecc.) si ribadisce che anche nella popolazione apparentemente in buona salute l'insufficiente apporto di Vitamina D è molto più frequente di quanto si potesse prevedere solo alcuni anni fa. Ciò potrebbe suggerire che, in particolari casi, vi sia la necessità di somministrare idonei supplementi di Vitamina D. Tale considerazione è stata peraltro evidenziata anche nel corso del 5° Simposio Internazionale sugli aspetti Nutrizionali dell'Osteoporosi di Losanna del 2003 e da ulteriori studi apparsi recentemente in diverse pubblicazioni internazionali.

Bibliografia

- Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, et al. Maternal Vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3517-22.
- Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, et al. Estimates of optimal Vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 713-6.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of Vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: Suppl:1689S-96S.
- Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med.* 2009; 169: 384-90.
- Gloth FM 3rd, Alam W, Hollis B. Vitamin D vs broad spectrum phototherapy in the treatment of seasonal effective disorder. *J Nutr Health Aging.* 1999; 3: 5-7.
- Holick MF. Calcium plus Vitamin D and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2287-88.
- Holick MF. High prevalence of Vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Oroc.* 2006; 81: 353-73.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007; 357: 266-81.
- Hypponen E, Laara E, Reunanen A, et al. Intake of Vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358: 1500-3.
- Krause R, Buhning M, Hopfenmuller W, et al. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet* 1998; 352 (9129): 709-10.
- Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, et al. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85: 1586-91.
- Lee DM, Tajar A, Ulubaev A, et al. Association between 25-hydroxyvitamin D levels and cognitive performance in middle-aged and older European men. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 772-9.
- McGrath J, Selten JP, Chant D. Long-term trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration data from Australia and the Netherlands. *Schizophr Res.* 2002; 54: 199-212.
- Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Reum.* 2004; 50: 72-7.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62: 60-5.
- Ponsonby AL, McMichael A, van der Mei I. Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology* 2002; 181: 71-8.
- Rostand SG. Ultraviolet light may contribute to

geographic and racial blood pressure differences.
Hypertension 1979; 30: 150-6.

Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, et al. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type 1 diabetes in offspring. *Diabetologia* 2000.; 43: 1092-8.

Wallis DE, Penckofer S, Sizemore GW. The “sunshine deficit” and cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 118: 1476-85.

Corrispondenza

Dr. Ugo Qualizza

DPT di Diagnostica di Laboratorio,
Azienda Ospedaliero Universitaria
Santa Maria della Misericordia – Udine,
tel. 0039 0432 555366, 0039 0432 552329;
e-mail: qualizza.ugo@aoud.sanita.fvg.it

Pervenuto il 13/05/2013

LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE NELLE PATOLOGIE IMMUNITARIE: L'ESEMPIO DELL'ALLERGIA ALIMENTARE

VITTORIO SARGENTINI

U.O.C. Patologia Clinica P.T.P Nuovo Regina Margherita, ASL RM/A – ROMA

L'allergia alimentare può essere definita come una risposta immune avversa che si verifica con carattere di riproducibilità in seguito all'esposizione ad un determinato cibo (Johansson SG, et al, 2004). La percentuale delle reazioni allergiche ai diversi alimenti, dimostrate attraverso test di scatenamento in doppio cieco controllato con placebo, varia a seconda del tipo di alimento, attestandosi tra l'1% e il 10,8% verso latte, uova, pesci e arachidi, tra lo 0,1% e il 4,3% verso frutta e noci, tra lo 0,1% e l'1,4% verso altri vegetali e inferiori all'1% verso grano, soia e sesamo (Zuidmeer L, et al, 2008). Negli ultimi anni si è evidenziato un notevole incremento di allergie alimentari, soprattutto nei bambini, al punto che l'Accademia Europea di Allergologia ed Immunologia Clinica, nel Congresso di Ginevra del 2012 ha sentito la necessità di lanciare un allarme evidenziando come queste rappresentino la prima causa di anafilassi nei soggetti fino a 14 anni, con un terzo di casi di shock registrati durante l'orario scolastico quando è maggiore il pericolo di entrare a contatto con i cibi a rischio e con un incremento, di almeno 7 volte, dei casi in cui la reazione allergica ha comportato il ricorso al pronto soccorso.

Particolare importanza nell'allergia alimentare rivestono le modalità di sensibilizzazione. Questa può avvenire primariamente nel tratto gastrointestinale, attraverso la cute, la placenta o il latte materno (sensibilizzazione di tipo I) ed è, in questo caso, legata prevalentemente ad allergeni alimentari di classe I che contengono epitopi sequenziali, stabili al calore, acido e proteasi resistenti; oppure essere una sensibilizzazione secondaria, a partenza dall'apparato respiratorio (sensibilizzazione di tipo II) e legata ad antigeni pollinici cross-reattivi con allergeni presenti per lo più nella frutta e nei vegetali, contenenti epitopi di tipo conformazionale labili al calore e sensibili alle proteasi, gli allergeni alimentari di classe II. L'allergia sostenuta dalla presenza di IgE rivolte contro antigeni sequenziali tende ad essere persistente, con manifestazioni cliniche di tipo sistemico e spesso anafilattico che si manifestano prevalentemente nell'infanzia e nell'adolescenza; quella sostenuta dalle IgE rivolte verso antigeni conformazionali tende ad essere transitoria con manifestazioni cliniche prevalentemente a livello orale e faringeo che compaiono in particolare negli adulti.

Negli ultimi anni è stato possibile, grazie all'uso di tecniche di biologia molecolare, identificare, clonare e produrre, sotto forma di proteine ricombinanti, un

notevole numero di molecole allergizzanti, tra le quali molte di quelle responsabili di allergie alimentari. La *Component resolved diagnosis* (CRD), detta anche *Molecular diagnosis* (MD), che utilizza al posto degli estratti le componenti allergeniche rappresentate dagli allergeni molecolari, purificati o ricombinanti, consente di identificare gli allergeni per i quali un paziente si è sensibilizzato, permette di distinguere le sensibilizzazioni primarie dalle forme di cross-reattività e può avere un elevato valore predittivo sulla severità delle manifestazioni cliniche. In particolare, nelle forme di allergia alla frutta della famiglia delle Rosaceae e alla frutta secca, sulla base del profilo allergologico di sensibilizzazione del singolo soggetto, ottenuto attraverso l'impiego della diagnostica molecolare, è possibile definire il fattore di rischio di reazioni gravi in seguito all'assunzione dell'alimento, che è basso per le *profiline* e le *PR-10* e va ad aumentare per le *Lipid Transfer Protein* (*LT-Ps*), le *2S albumine* e le *Cupine*.

Esaminando più dettagliatamente le diverse famiglie di molecole presenti negli alimenti, le *Bet v1-like*, *PR-10* e le *profiline*, presenti in tutto il mondo vegetale, possono essere responsabili, in seguito ad ingestione, di sintomi prevalentemente locali, nonché di forme di sindrome orale allergica (Ebner C, et al, 1995). Reazioni molto più gravi, sempre nell'ambito dell'allergia alla frutta, possono avvenire in caso di positività verso molecole appartenenti alla categoria delle *Lipid Transfer Protein* (*LTPs*). Si tratta di proteine utilizzate per il trasporto di lipidi, dotate di elevata resistenza al calore e agli enzimi digestivi e che pertanto non vengono inattivate né dalla cottura dei cibi, né dalla digestione. Sono presenti, prevalentemente, nella frutta fresca della famiglia delle Rosaceae, pesca, mela, albicocca, prugna, ciliegia, localizzate subito sotto la buccia (*Pru p3*, *Mal d3*, *Pru ar3*, *Pru av3*), nella frutta secca, noci e nocciole (*Cor a8*) e nelle arachidi (*Ara h9*). La presenza di una sensibilizzazione verso queste molecole espone al rischio di reazioni sistemiche spesso severe, quali asma, orticaria, fino a vere e proprie forme di anafilassi in seguito ad ingestione degli alimenti che le contengono (Pastorello EA, et al, 2011).

Questo problema riguarda prevalentemente le popolazioni mediterranee, mentre nei paesi nord europei sono prevalenti le forme di sensibilizzazione verso le *PR-10*, responsabili di sintomatologie locali (Schmidt Andersen MB, et al, 2011).

Nell'allergia alle nocciole, la presenza di IgE specifi-

che verso le due storage protein *Cor a9* e *Cor a14*, è significativa di una sensibilizzazione primaria a questo alimento e la sensibilizzazione a una o ad entrambe queste componenti è frequentemente associata al rischio di reazioni sistemiche gravi (Masthoff L, et al, 2013).

Jug r1 è la storage protein indicativa di una sensibilizzazione primaria alla noce associata anch'essa al rischio di reazioni sistemiche gravi nei pazienti allergici a questo frutto, mentre *Jug r3* rappresenta la relativa LTP (Roux K, et al, 2003). Nei bambini la prevalenza di allergia alla noce è stimata intorno al 4%, mentre negli adulti questo frutto rappresenta uno degli alimenti che, anche in piccole quantità, può scatenare reazioni indotte da esercizio fisico in presenza di altri co-fattori quali l'assunzione di FANS o di alcool.

Nei semi di soia e nelle arachidi, le molecole allergizzanti sono rappresentate soprattutto dalle Lipid Transfer Protein (nsLTP) e dalle proteine di deposito. Per quanto riguarda la soia, la presenza di IgE specifiche vs β conglucina (*Gly m 5*) e glicina (*Gly m 6*) indica una sensibilizzazione primaria, presente in più di 1/3 dei pazienti allergici a questo alimento e responsabile nella maggior parte dei casi di reazioni sistemiche. La PR-10 (*Gly m 4*) è invece una molecola costituita da 158 AA, di 16,7 Da. In natura svolge un'azione biologica di difesa e la presenza di sIgE vs questa proteina è dovuta probabilmente ad una sensibilizzazione primaria alle *fagales*, generalmente associata a SOA (Holzhauser T, et al, 2009; Kleine-Tebbe J, et al, 2002). Si ritiene che circa il 10% dei pazienti con sensibilizzazione al polline di betulla sia anche a rischio per reazioni alla soia, includendo sintomatologie sistemiche per esempio quando si ingeriscono alte quantità di alimento semilavorato ("low processed soy") come il latte di soia (Mittag D, et al, 2004; Kosma P, et al, 2011).

Relativamente alle arachidi, la vicilina (*Ara h 1*), la 2S albumina (*Ara h 2*) e la 11 S globulina (*Ara h 3*) sono i *markers* di sensibilizzazione genuina; sono proteine stabili e rappresentano un elevato rischio di reazioni sistemiche severe, più gravi se è presente una sensibilizzazione a più componenti. *Ara h 8* è una PR-10 (Bet v1 omologa), mentre la presenza di sIgE vs ns LTP (*Ara h 9*) è spesso associata a reazioni sistemiche più severe in aggiunta a SOA, soprattutto nei paesi dell'Europa Meridionale. La frequenza dell'allergia alle arachidi dipende fortemente dalla latitudini e dalle abitudini della popolazione in studio, tuttavia alcune pubblicazioni hanno evidenziato una prevalenza dell'1-2% nei bambini (Mortz CG, et al, 2011; Tariq et al, 1996; Moneret-Vautrin DA, et al, 1996). Di recente è stato confermato che pazienti allergici alla soia con IgE anti *Gly m 5* e/o anti *Gly m 6* possono avere cross-reazioni alle omologhe proteine di deposito delle arachidi *Ara h 1* e/o *Ara h 3* (Moneret-Vautrin DA, et al, 1996).

Nel corso degli ultimi anni si è verificato un notevole aumento del consumo di soia e di arachidi. La soia,

infatti, che è un alimento ad elevato contenuto proteico, è largamente utilizzata non solo a scopo nutrizionale, ma anche come sostanza in grado di ridurre il livello di colesterolo nel sangue, di contrastare i sintomi della menopausa e di prevenire malattie cardiovascolari ed osteoporosi. I semi di soia sono stati spesso citati come uno degli alimenti scatenanti reazioni IgE mediate nei bambini. Per le sue qualità nutritive la soia è impiegata anche come sostitutivo del latte vaccino nei bambini con reazioni avverse a quest'ultimo, tuttavia una importante percentuale di questi bambini sviluppa una reazione anche al legume. Attualmente è stata calcolata una prevalenza dello 0,3 – 0,4% nella popolazione generale con il 6% nei bambini atopici ed il 14% nei pazienti con allergia al latte vaccino (L'Hocine L, Boye J, 2007). Le arachidi sono largamente impiegate nell'industria alimentare (soprattutto dolciaria) e quindi diffusamente presenti direttamente o come derivati, in una notevole quantità di cibi confezionati.

Paragonabile per gravità all'allergia all'arachide è l'allergia all'anacardio, che spesso si presenta associata a quella per il pistacchio. IgE specifiche rivolte verso *Ana o3* sono indicative di una sensibilizzazione primaria a questo alimento.

Attualmente, l'introduzione della diagnostica molecolare ha reso possibile una più corretta gestione dei pazienti allergici, potendo distinguere forme di allergia primaria e forme dovute a cross reattività verso proteine simili presenti in diverse sorgenti allergeniche. Sono stati pertanto proposti degli algoritmi da utilizzare nel percorso diagnostico in caso di sospetta allergia alla soia e alle arachidi, con l'impiego degli estratti interi e delle singole molecole specifiche.

Nell'allergia al grano, la positività verso la molecola *Tri a19* (ω 5-gliadin) può esporre al rischio di reazioni sistemiche, anche gravi, indotte dall'esercizio fisico entro quattro ore dall'ingestione di questo alimento, favorite dall'aumento di temperatura corporea (Park HJ, et al, 2012). Anche nel grano è presente una LTP rappresentata dal *Tria a14*, responsabile di molte reazioni allergiche da ingestione, da contatto e da inalazione delle farine di grano. Gliadin rappresenta la frazione non idrosolubile del grano e include le gliadine α β γ e ω . Le IgE gliadin-specifiche rappresentano un marker utile per la valutazione del rischio di reazioni sistemiche ed il loro valore è stato recentemente apprezzato per la diagnosi di WDEIA (*Weather-dependent exercise-induced anaphylaxis*) nei pazienti ω 5-gliadin negativi.

L'uovo, insieme al latte, è uno degli alimenti più frequentemente responsabili di allergia nei primi anni di età del bambino, e la sua esclusione dalla dieta spesso non è risolutiva in quanto esso è frequentemente presente, come ingrediente, in numerose preparazioni alimentari. Anche in questo caso, con la diagnostica molecolare, possiamo ottenere importanti informazioni che permettono di dare indicazioni sulla dieta del bambino allergico a questo alimento.

Nell'uovo, infatti, l'albume contiene un discreto numero di proteine, rappresentate, tra gli allergeni maggiori, per l'11% dal *Gal d1 (ovomucoide)*, per il 54% dal *Gal d2 (ovalbumina)*, per il 12% dal *Gal d3 (Conalbumina)* e per il 3,4% dal *Gal d4 (lysozima)*.

Nei soggetti allergici all'uovo, la presenza di una sensibilizzazione nei confronti dell'*ovomucoide, Gal d1*, gastro e termoresistente, è indicativa di una minore tollerabilità all'alimento cotto (Ando H, et al, 2008); inoltre il monitoraggio nel tempo dei livelli sierici di *ovomucoide*, dà indicazioni sullo sviluppo di tolleranza all'alimento, in quanto bambini con allergia all'uovo persistente hanno livelli di *ovomucoide* significativamente più elevati rispetto a chi sviluppa tolleranza e la comparsa della stessa può essere indicato da una diminuzione nel tempo dei livelli di IgE verso questa proteina (Jarvinen KM, et al, 2007). È importante inoltre ricordare che il *lisozima* è spesso utilizzato nelle preparazioni alimentari come conservante e additivo per prevenire la formazione di colonie batteriche senza essere adeguatamente segnalato tra i componenti delle confezioni.

Relativamente alle proteine del latte, queste si possono dividere in due classi principali: le frazioni della caseina e le proteine del siero; *a-lattoalbumina (Bos d4)* e *β-lattoglobulina (Bos d5)* sono due frazioni labili al calore, indicatori di rischio di reazione al latte

fresco, i cui livelli diminuiscono in caso di sviluppo di tolleranza. La *siero albumina bovina Bos d6*, anch'essa labile al calore, rappresenta l'allergene principale nella carne di bue. La *caseina (Bos d8)*, particolarmente stabile al calore e alla digestione, rappresenta il vero e proprio marker di valutazione del rischio in quanto indicatore di possibili reazioni verso tutte le forme di latte (cotto e fresco) e verso prodotti come torte e biscotti contenenti latte cotto (Docena GH, et al, 1996). La valutazione nel tempo dei livelli di IgE specifiche verso la caseina permette di valutare lo sviluppo di tolleranza in caso di diminuzione dei valori iniziali (Nowak-Wegrzyn A, et al, 2008).

Occorre inoltre sempre ricordare che la caseina può essere presente in forma nascosta come additivo in alcuni alimenti quali cioccolato, salsicce e altri (Boyano-Martinez T, et al, 2009).

Tra gli allergeni potenzialmente pericolosi occorre poi ricordare le *parvalbumine, Cyp c1* (allergene maggiore della carpa), *Gad c1 (merluzzo)*, *Sal s1 (salmone)*, proteine molto stabili, che possono spiegare fenomeni di cross reattività tra i vari tipi di pesce.

Le componenti molecolari utilizzabili per la diagnostica di laboratorio delle allergie alimentari sono oggi molto numerose. Le principali sono elencate nella tabella 1, suddivise per famiglia proteica.

FAMIGLIA PROTEICA (O SORGENTE ALLERGENICA)	ALLERGENE
Superfamiglia delle cupine Vicilline Legumine	Ara h 1 (arachide) Ara h 3 (arachide), Cor a 9 (nocciola)
Superfamiglia delle prolamine Albumine 2S Proteine di Trasferimento Lipidico (LTP) Prolamine dei cereali	Ber e 1 (noce brasiliana), Ara h 2 (arachide), Gly m 6 (soia) Pru p 3 (pesca), Cor a 8 (nocciola), Art v 3 (Composite), Tri a 14 (grano), Jug r 3 (noce) Tri a 19 (grano)
Proteine di patogenesi -10 PR10: proteine intracellulari PR3: chitinasi di Classe 1	Pru p 1 (pesca), Api g 1 (sedano), Gly m 4 (soia) Hev b 11, Hev b 6.02 (latice, banana, avocado)
Profiline	Pru p 4 (pesca) (Bet v 2, Phl p 12, Hev b 8)
Determinanti carboidratici cross-reattivi	MUXF3 (sedano, pomodoro, zucchini)
Tropomiosine	Pen a 1 (gambero)
Calcium binding protein	Gad c 1 (merluzzo)
Proteine del latte	Bos d 4 (a-albumina) Bos d 5 (b-lattoglobulina) Bos d 4 (caseina) Bos d lactoferrin (lattoferrina)
Proteine dell'uovo	Gal d 1 (ovomucoide) 39 Gal d 2 (ovalbumina) Gal d 3 (conalbumina) Gal d 4 (lisozima)

Tab. 1. Alcuni degli allergeni importanti dal punto di vista epidemiologico disponibili per la diagnostica molecolare.

In laboratorio la diagnosi molecolare può essere attuata attraverso due distinte strategie: una diagnosi mirata che impiega le singole componenti molecolari e che può essere eseguita con lo stesso sistema utilizzato per la ricerca delle IgE specifiche verso gli estratti, applicando dei veri e propri algoritmi diagnostici di approfondimento, oppure una diagnosi non mirata mediante l'utilizzo di matrici di allergeni precostituite, i *microarray* (Harwanegg C, Hiller R, 2006; Ott H, et al, 2008). L'uno o l'altro dei due sistemi potranno essere impiegati di volta in volta, tenendo conto delle particolari situazioni cliniche, del numero di molecole da testare e della disponibilità delle stesse. Relativamente alla diagnostica su *microarray*, questa, nella sua versione più recente, permette di determinare contemporaneamente e con una piccola quantità di siero (30 µl) IgE rivolte verso 112 molecole diverse, delle quali 43 sono di origine alimentare. Si tratta di un test che presenta una minore specificità globale rispetto ai test tradizionali e che espone al rischio del riscontro di positività inattese, spesso di difficile gestione. Il suo utilizzo può trovare applicazione soprattutto quando sia necessario testare numerose molecole (>12), nelle polisensibilizzazioni, nelle situazioni cliniche particolarmente complesse, nei casi pediatrici quando si abbia una limitata quantità di siero a disposizione e qualora si ricerchino IgE specifiche rivolte verso componenti molecolari presenti esclusivamente nel *microarray*.

Bibliografia

Ando H, Moverare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres MP, Urisu A. Utility of ovomucoid- specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:583-8.
 Boyano-Martinez T, Garcia-Ara C et al. Accidental allergic reactions in children allergic to cow's milk proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(4):883-888.
 Docena GH, Fernandez R et al. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996;51(6):412-416.
 Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v1 and Bet v2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:962-969.
 Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;38:232-6.
 Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J et al: Pru p3-sensitized Italian peach-allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also present antibodies to Pru p1 and Pru p4. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:362-372.
 Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the

diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;38:232-6.

Schmidt Andersen M-B, et al. Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP and profilin from Rosaceae fruits. *Clinic Rev Allergy Immunol* 2011; 41(1): 4-19 .

Holzhauser T et al. Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(2): 452-8.

Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Samson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy* 2007;62:758-65.

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832-836.

Kleine-Tebbe J et al. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 797-804.

Kosma P et al. Severe reactions after the intake of soy drink in birch pollen-allergic children sensitized to Gly m 4. *Acta Paediatrica* 2011; 100: 305-307.

L'Hocine L, Boye J. Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2007; 47: 127-143.

Masthoff L, et al. Sensitization to Cor a9 and Cor a14 is highly specific for a severe hazelnut allergy in Dutch children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2013 (In press).

Mittag D et al. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 148-154.

Moneret-Vautrin DA et al. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005; 60: 443-451.

Mortz CG et al. The prevalence of peanut sensitization and the association to pollen sensitization in a cohort of unselected adolescents – The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis (TOACS). *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16: 501-506.

Nowak-Węgrzyn A, Bloom KA et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(2):342-347.

Ott H, Baron JM, Heise R, Oklenburg C, Stanzel S, Merk HF et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy* 2008;63:1521-8.

Park HJ et al. Diagnostic Value of the Serum-Specific IgE Ratio of Omega-5 Gliadin to Wheat in Adult Patients with Wheat-Induced Anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157(2):147-50.

Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J et al: Pru p3-sensitised italian peach-allergic patients are less likely to develop severe symptoms when also presentino antibodies to Pru p1 and Pru p4. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:362-372.

Roux K, et al. Tree nut allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:234-244.

Tariq et al. Cohort study of peanut and tree nut sensitization by age of 4 years. *BMJ* 1996; 313(7056): 514–517.

Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1210-1218.

Pervenuto il 29/01/2014

NGAL: MARKER PREDITTIVO DI INSUFFICIENZA RENALE NEI PAZIENTI TRAPIANTATI?

DONATO TUMMILLO, ROSANNA BENEVENTI, GIUSEPPE MAZZITELLI

U.O.S. Laboratorio di Urgenza, Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza

Summary

NGAL performs an important diagnostic and prognosis biomarker for AKI detection: it rises in blood and urine 2 hours after a nephrotoxic injury. The objective of this study is to verify if NGAL can be useful and valid in monitoring transplant patients for the early detection of AKI. 38 patients were tested in this study and were monitored for 24 months, using a fluorescent immunoassay, were divided into different groups, in all the patients creatinine values were always within normal values. The study showed that 3 patients, marrow transplanted, had regular NGAL values. High concentrations were detected in 3 patients, 2 marrow and 1 kidney transplanted, who were treated with cyclosporine, and showed abnormal NGAL concentrations and normal creatinine values, followed by normalization during the next 7 days. 13 Patients treated with tacrolimus, 8 kidney, 4 liver, 1 heart transplanted, showed higher NGAL values than patients treated with cyclosporine. In the patients, who received a new kidney from dead donor, 2 treated with cyclosporine and 1 with tacrolimus, NGAL concentrations were high since the first observation and creatinine values rised up a week after. The use of cyclosporine and tacrolimus could cause a nephrotoxic damage, that can produce high transitory NGAL levels, without AKI development. It was also determined that the 13 patients treated with tacrolimus had high levels of NGAL. So NGAL can be used as a marker for AKI early detection.

Keywords: NGAL (Neutrophil Gelatinase- Associated Lipocalina) ARF (Acute Renal Failure) IRA (Insufficienza Renale Acuta)

AKI (Acute Kidney Injury RIFLE (Risk Injury Failure Loss End-Stage Kidney)

Introduzione

L'I.R.A. o ARF (Insufficienza Renale Acuta/Acute Renal Failure) o AKI (Schrier, 2004; Devarajan, 2007) per gli anglosassoni (Acute Kidney Injury) termine preferito, allo stato attuale, in quanto "injury" (insulto), sottintende uno stato di danno renale che precede temporalmente l'instaurarsi di una lesione funzionale conclamata, rappresenta un problema clinico ad alta frequenza ed incidenza (5%) (Uchino et al, 2005) nei pazienti ospedalizzati per traumi, interventi chirurgici, sepsi, somministrazione di farmaci o mezzi di contrasto nefrotossici, malattie multisistemiche di tipo cronico (diabete) e malattie critiche (scompenso cardiaco). Nei pazienti "critici" quali quelli ricoverati nelle terapie intensive (cardiochirurgiche, rianimazione e neurochirurgia) l'incidenza può arrivare al 50%.

Nell'ambito dell'"Interventistica Chirurgica e Radiologica" è, senza dubbio, una delle complicanze più frequenti e temibili in quanto può rappresentare il primo segnale di una sepsi grave o di uno stato di shock.

L'insorgenza dell'AKI è rapida: i reni perdono progressivamente la capacità di filtrazione, la diuresi si contrae fino a condurre il paziente alla necessità di essere sottoposto a dialisi o, nella peggiore delle ipotesi, il danno può rivelarsi tanto grave da condurre ad exitus il paziente. Dal punto di vista teorico, la riduzione della funzionalità renale spiega il corteo sintomatologico, sia obbiettivo che subbiettivo, ma non

consente di accertare "ab initio" la noxa patogena che ne ha determinato l'instaurarsi e, soprattutto, non consente al clinico di stabilire e quantificare l'entità reale del danno per instaurare un'opportuna e rapida condotta terapeutica (dialisi).

I criteri R.I.F.L.E. (Bellomo et al, 2004) sono stati, per anni, i parametri più comunemente utilizzati per la diagnosi di IRA e, sebbene incompleti, rappresentano ancora oggi un utile strumento per la stratificazione del rischio (Fig.1).

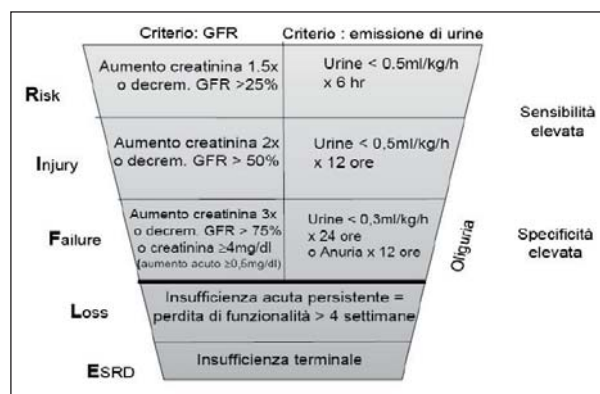


Fig 1. Criteri RIFLE da Bellomo et al. Crit Care 2004.

A partire dal 2004 (Metha et al, 2007), un network AKIN di nefrologi ed interventisti (Tab 1) (Baghshaow et al, 2006), ha cercato di ampliare le conoscenze sui meccanismi alla base dell'AKI, di fissare dei nuovi criteri per la definizione (Tab 2) e di indivi-

CLASSIFICAZIONE /SISTEMA DI STADIAZIONE DEL DANNO RENALE ACUTO (AKI) MODIFICATO DA RIFLE (RISK, INJURY, FAILURE, LOSS OF KIDNEY)		
STADIAZIONE	CRITERI CREATININA SIERICA	CRITERI CREATININA URINARIA
1	Aumento della creatinina sierica superiori o pari allo 0,3 mg / dl o un aumento maggiore o uguale dal 150% al 200% (da 1,5 a 2 volte) rispetto ai livelli basali	Meno di 0.5 ml/Kg per ora o più di 6 ore
2	Aumento della creatinina sierica per oltre il 200% e il 300% (> 2 a 3) dai livelli basali	Meno di 0.5 ml/Kg per ora o più di 12 ore
3	Aumento della creatinina sierica per oltre il 300% (> 3 volte) rispetto ai livelli basali (o creatinina sierica superiore o uguale a 4,0 mg / dl, con un aumento acuto di almeno 0,5 mg/dl)	Meno di 0,3 ml/kg per ora, per 24 ore o anuria per 12 ore

Tab. 1. da Bagshaow S., Geroge C., Dinu I. Bellomo R.

	RIFLE	AKIN
UTILIZZO FILTRATO?	SI	NO
VARIAZIONE CREATININEMIA	0,5 MG/DL	0,3 MG/DL
INTERVALLO DI TEMPO	ENTRO 1 SETTIMANA	ENTRO 48 h
STATO DI IDRATAZIONE		SOLO DOPO "FLUID RESUSCITATION"

Tab. 2. Differenza tra criteri RIFLE e AKIN da Mehta RL et al. Crit Care 2007; 11:R31.

duare dei nuovi markers in grado di evidenziare precocemente (4-8 ore) sia il danno molecolare che quello funzionale.

Il dosaggio della creatinina sierica, insieme alla contrazione della diuresi, hanno rappresentato per decenni gli unici e storici markers in grado di evidenziare l'instaurarsi di un danno renale da AKI: l'esecuzione della creatinina ha il pregio di essere facilmente eseguibile e a basso costo, ma, sfortunatamente, un suo aumento risulta un indicatore poco affidabile,

sia perchè può risultare alterato in rapporto ad età, sesso, massa muscolare, farmaci e stato d'idratazione, sia perchè un suo aumento si verifica tardivamente rispetto all'insorgenza del danno molecolare.

È di fondamentale importanza, pertanto, disporre di un marcatore che permetta una diagnosi tempestiva che consenta di instaurare un trattamento terapeutico rapido ed opportuno.

Studi recenti, hanno aggiunto nuove conoscenze nell'ambito dei marcatori endogeni di funzione renale in pazienti "a rischio".

A partire dal 1992 diversi autori, (Triebel et al, 1992; Kielsen et al, 1993) hanno isolato nei granulociti neutrofili umani attivati una proteina, NGAL, conosciuta anche con i sinonimi lipocalina 2 oncogene proteina 24p33 o uterocalina 4 nel topo (Stoesz et al, 1998), e neu-related lipocalin 5 o 25 kDa alpha 2-microglobulin-related-protein nel ratto.

NGAL è l'acronimo che definisce la Gelatinasi Neutrofila Associata alla Lipocalina (Kielsen et al, 1993), molecola proteica di piccole dimensioni (Fig 2), appartenente alla superfamiglia delle lipocaline, che comprende circa 20 proteine di dimensioni variabili (160 -180 amminoacidi definite in base alla loro struttura tridimensionale, coinvolte nell'immagazzinamento e nel trasporto di una serie di macromolecole complesse idrofobiche (Flower, 1996; Flower et al 2000).

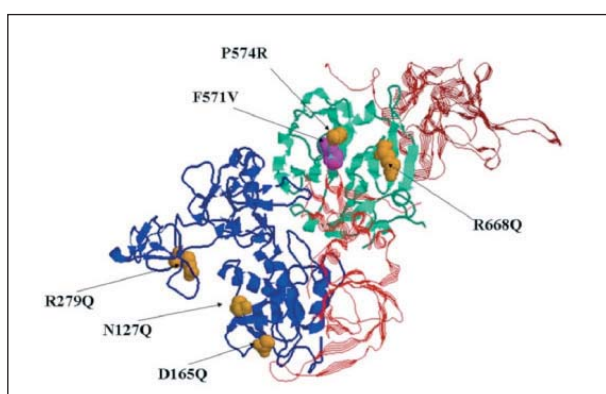


Fig. 2. Struttura di NGAL

La forma umana di NGAL è rappresentata da un polipeptide di 178 AA di circa 22 KDa contenente un ponte disolfuro che, attraverso un processo di glicosilazione, aumenta la sua massa fino a 25 KDa.

La proteina è immagazzinata nei granuli azzurrofilici (Kielsen et al, 1993) dei granulociti neutrofili fino al rilascio in seguito all'attivazione degli stessi; nei granulociti neutrofili e nelle urine è presente sotto varie forme: monomero, dimero e trimero o complesso di 92 kDa chiamato anche gelatinasi B o metalloproteasi 9 (MMP-9) (Yan et al, 2001).

La funzione di NGAL non è, a tutto oggi, completamente nota e chiarita anche se molti sono gli studi e le ipotesi postulate; tuttavia, sembra certo che la proteina sia un regolatore cellulare in caso di stress, in corso di infezioni, infiammazioni, ischemie e neoplasie, in relazione alla sua "possibile" funzione antibatterica rappresentata dalla chelazione dei siderofori che priva i batteri del ferro necessario alla loro nutrizione (Goetz et al, 2002).

NGAL svolge, inoltre, un'azione protettiva nei riguardi della degradazione enzimatica e, per tale motivo, inizialmente, è stata considerata un marker d'infezione batterica.

Studi successivi hanno rilevato che NGAL è presente in risposta a stimoli ambientali, oltre che nei granu-

lociti neutrofili, anche in altri tessuti quali quelli dei tubuli renali, dell'apparato gastrointestinale, della prostata e dell'epitelio polmonare (Cowland, 1997; Friedl, 1999).

Livelli plasmatici inferiori a 60 ng/ml possono essere riscontrati in soggetti sani (Bolognani, 2008). Livelli plasmatici aumentati, anche se non particolarmente elevati, si riscontrano in corso di malattie sistemiche, apoptosi (Tong, 2005), gravidanze complicate da eclampsia e neoplasie (adenocarcinoma della mammella e carcinomi uroteliali).

Livelli plasmatici notevolmente elevati di NGAL si riscontrano, quale espressione di fattore di "fase acuta", in associazione ad un danno ascrivibile ad infezioni batteriche (Xu Sy et al, 1995) in quanto liberata dai granuli secondari dei neutrofili attivati e nelle flogosi.

NGAL, inoltre, in base alla capacità di legare la Matrix metalloproteinasi 9 (MMP 9) è stata correlata all'accrescimento e a fenomeni di metastatizzazione di diversi tipi di neoplasie; inoltre, aumenti dei livelli plasmatici, sia in forma semplice che complessa sono stati riscontrati in pazienti con neoplasie maligne quali carcinomi del polmone, della mammella, dell'ovaio, del colon, del pancreas e carcinomi uroteliali (Stoesz et al, 1998; Nielsen, 1996; Monier et al, 2000).

NGAL, data le sue piccole dimensioni e la resistenza ai processi di degradazione, è escreta direttamente nelle urine, dove è rilevabile e dosabile sia in forma libera che complessata (Kielsen et al, 1993; Yan et al, 2001).

La proteina è presente a livello renale (Ohisson et al, 2003), indipendentemente da processi infiammatori o infettivi, e concentrazioni plasmatiche aumentate della proteina sono state riscontrate in soggetti con riduzione della funzione renale provocata da vasculite sistemica, esposizione ad agenti nefrotossici (farmaci e mezzi di contrasto) e lesioni di tipo ischemico quali necrosi tubulare acuta e nefropatie tubulo-interstiziali (Bangert et al, 2006).

Allo stato attuale sembra rappresentare il marker di elezione di danno renale acuto, tanto da poter essere considerato il corrispettivo della troponina a livello cardiaco (Mishra et al, 2005).

Scopo del lavoro

Lavori scientifici presenti in Letteratura (Parikh et al, 2006; Mishra et al, 2006), hanno esaminato e descritto il comportamento di NGAL nei soggetti sottoposti a trapianto renale e midollare dosando la proteina nelle ore immediatamente successive all'intervento, ipotizzando che una sua diminuzione potesse essere messa in relazione con un buon funzionamento dell'organo trapiantato.

Scopo del presente lavoro è verificare se l'aumento della concentrazione di NGAL possa essere espressione precoce ed affidabile di una sofferenza renale che può precedere l'eventuale insorgenza di AKI nel

follow up di un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto d'organo in terapia farmacologica immunosoppressiva.

Per suffragare la fondatezza dell'ipotesi abbiamo monitorato, nel corso di 24 mesi, un numero ristretto di soggetti trapiantati per verificare se eventuali aumenti di NGAL fossero solo un fenomeno transitorio o un indice predittivo precoce di alterato funzionamento renale.

Materiali e metodi

Nell'arco di 24 mesi a partire dal gennaio 2010 nell'U.O.S.D. di Laboratorio di Urgenza dell'A.O. San Carlo di Potenza, sono stati monitorati 38 pazienti trapiantati in terapia immunomodulante, di provenienza ambulatoriale eterogenea: 13 dall'U.O. di Nefrologia, 7 dall'U.O. di Ematologia, 2 dall'U.O. di Medicina Generale, 2 dall'U.O. di Malattie Infettive, 1 dall'U.O. di Pediatria e 12 dall'Ambulatorio per esterni. I prelievi dei pazienti arruolati nello studio sono stati raccolti in provette contenenti K3 EDTA, secondo le raccomandazioni della Ditta produttrice della strumentazione, ed esaminati immediatamente dopo il prelievo o dopo centrifugazione e stoccaggio a -20°C, su Triage® Meter Plus BIOSITE System. Tale sistema analitico è costituito da due componenti: una cartuccia di test, che contiene tutti i reagenti necessari, ed il Triage® Meter Plus, un Point of Care che utilizza un immunodosaggio a fluorescenza per la determinazione quantitativa delle proteine cardiache e di NGAL. Dopo l'aggiunta del campione di sangue nel pozzetto, le cellule vengono separate dal plasma attraverso un filtro contenuto nel dispositivo di analisi. L'aliquota di plasma reagisce con coniugati fluorescenti dell'anticorpo monoclonale murino all'interno della camera di reazione; dopo circa 20 minuti d'incubazione la soluzione scorre, per azione capillare, lungo l'area di rilevazione del dispositivo di analisi. Il complesso costituito dall'analita e dal coniugato fluorescente dell'anticorpo è catturato su regioni separate che determinano dei profili di reazione specifici per l'analita.

La presenza di NGAL nel campione impedisce ai coniugati fluorescenti di legarsi alla fase solida della zona di rilevazione in modo che la concentrazione dell'analita sia inversamente correlata alla fluorescenza rilevata. Gli intervalli di normalità di NGAL, per il nostro laboratorio, sono stati calcolati sul Triage® Meter Plus BIOSITE in un gruppo di 144 donatori provenienti dall'U.O. di Centro Trasfusionale: 64 di sesso maschile e 80 femminile, di età media di 48,8 per i maschi e 47,62 per le donne, con valori di creatinina compresi fra 0,44-1,58 ng/ml. Il limite superiore del range di riferimento non parametrico (percentile 95%) della popolazione di riferimento è risultato di 147,77 ng/ml (intervallo di confidenza al 90% di 100-194 ng/ml). Range misurabile di NGAL: 60-1300 ng/ml.

Risultati

I 38 pazienti selezionati per lo studio sono stati suddivisi in base al tipo di organo trapiantato (25 di rene, 8 di midollo, 4 di fegato e 1 di cuore), all'età, al sesso (27 maschi e 11 femmine) ed al tipo di terapia praticata (25 con ciclosporina e 13 con tacrolimus). In tutti i pazienti, all'atto dell'arruolamento il dosaggio della creatinina, effettuato su strumento UniCel DX C600i Beckman Coulter, è risultato nel range di normalità. Il monitoraggio periodico mensile di ciascun paziente ha rilevato che la terapia immunosoppressiva ha esercitato un influsso notevole e variabile sui valori di NGAL:

- Solo tre pazienti sui 38 studiati (2 maschi e 1 femmina), trapiantati di midollo, in terapia con ciclosporina, hanno presentato valori di NGAL inferiori a 60 ng/ml durante tutto il periodo di osservazione;
- Tre pazienti (2 maschi ed 1 femmina), rispettivamente 2 trapiantati di midollo ed 1 di rene, in terapia con ciclosporina, hanno presentato un andamento dei valori di NGAL di non facile interpretazione: nel tempo si sono riscontrate oscillazioni dei valori compresi fra il range di normalità (<60 ng/ml) e valori francamente patologici superiori anche al limite misurabile (>1300 ng/ml), che si sono successivamente, in circa una settimana, normalizzati mostrando un andamento di tipo "altalenante" (grafico1) con picchi rispettivamente di 500, 970, e >1300 ng/ml; i valori della creatinina dosati contemporaneamente sono sempre risultati compresi fra 0,60-1,50 ng/ml;

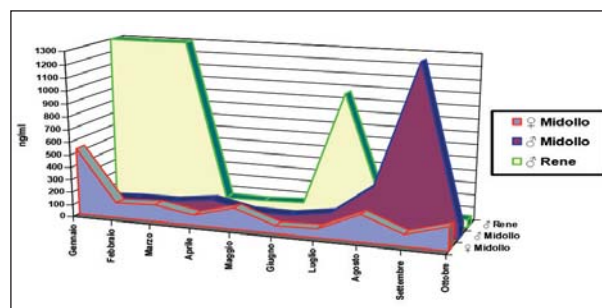


Grafico 1. Andamento di NGAL di tipo altalenante.

- Negli altri 32 pazienti, sia in terapia con ciclosporina che con tacrolimus, si sono riscontrati valori di NGAL superiori alla norma, compresi fra 185 e 510 ng/ml.
- Nei riguardi della terapia si è constatato che tutti i pazienti in terapia con tacrolimus (9 maschi e 4 femmine; 8 trapiantati di rene, 4 di fegato e 1 di cuore; età media 53 anni) hanno presentato valori di NGAL (valore medio 298 ng/ml) nettamente superiori rispetto a quelli riscontrati nei pazienti in terapia con ciclosporina. È da sottolineare tuttavia che i dati potrebbero essere poco significativi considerato il numero esiguo dei soggetti osservati: 13 casi.

- In tre pazienti trapiantati di rene da cadavere (2 in terapia con tacrolimus ed 1 in terapia con ciclosporina) i valori di NGAL sono risultati superiori a 300 ng/ml fin dalla prima osservazione, molto prima dell'elevazione della creatinina che ha presentato un incremento dei valori soltanto dopo circa una settimana.

Discussione e conclusioni

Negli ultimi 50 anni non sono stati evidenziati marcatori in grado di permettere una precoce, sensibile e specifica identificazione del danno renale acuto (Allgren et al, 1997).

Molti ricercatori si sono impegnati nel valutare l'utilità del dosaggio della NGAL in diverse situazioni cliniche, al fine di evidenziare la possibile associazione fra l'aumento dei livelli sierici della proteina e l'insorgenza di insufficienza renale.

Nell'ambito ospedaliero numerose sono le aree in cui il dosaggio di NGAL rappresenta un utile parametro quale indice predittivo di sofferenza renale e, fra questi, notevole interesse destano i pazienti trapiantati (rene, fegato, cuore, midollo e pancreas) in terapia con immunosoppressori.

Il presente studio, sebbene preliminare ed incompleto, ha permesso di evidenziare una serie di dati abbastanza interessanti da cui è, innanzitutto, emerso il ruolo che NGAL svolge, in via precoce, nel mettere in evidenza la gravità della situazione clinica generale oltre al differente rischio per quanto riguarda l'evoluzione dell'AKI. La nostra attenzione si è inoltre focalizzata sul coinvolgimento del marcatore negli adattamenti sistemici al trapianto: la somministrazione di farmaci immunosoppressori nei soggetti trapiantati, da sempre, ha suscitato un notevole interesse in ambito clinico, dal momento che può determinare un danno a livello renale, dose dipendente e, probabili anomalie funzionali, di solito reversibili, dopo la sospensione del trattamento terapeutico o riduzione della dose di somministrazione.

L'aumento dei valori di NGAL, data la sensibilità della proteina a liberarsi precocemente dopo una qualsiasi, anche minima, noxa nefrotossica, sembra rappresentare il marker più idoneo ad evidenziare un danno molecolare iniziale, anche temporaneo, probabilmente dovuto alla dose del farmaco somministrato.

NGAL, alla luce di quanto emerso dal presente studio, sembra avere il pregio di essere una proteina, al pari della troponina a livello cardiaco, idonea al precoce riconoscimento dell'AKI ed in grado di predirne l'insorgenza entro poche ore dall'istaurarsi dell'insulto.

L'esecuzione del dosaggio di NGAL non presenta particolari difficoltà di ordine metodologico e può essere, pertanto, effettuato in maniera agevole, sia immediatamente dopo il trapianto che nel follow up. I valori aumentati di NGAL consentono interventi terapeutici tempestivi che possono riflettersi in maniera

positiva sia sul decorso della progressione dell'AKI sia sulla scelta delle strategie terapeutiche da adottare quali la riduzione o la sospensione della terapia.

Bibliografia

- Allgren R, Marbury T, Rahman SN, Weisberg LS, Fenves AZ, Lafayette R, Sweet R, Genter F, Kurnik B, Conger J, Sayegh M. Anaritide in acute tubular necrosis. Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 828-834.
- Bagshaow S, George C, Dinu I, Bellomo R. A multicentre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Oxford Journals Medicine, Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; 23:1203-1210.
- Bangert K, Rossen M, Schoidt F, et al. Increased serum NGAL levels predict death in acetaminophen intoxicated patients. *Intensive Care Med* 2006;32: 1-162.
- Bellomo R, Ronco C. Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). *Group Critical Care* 2004; 8:204-212.
- Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, Romeo A, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, (NGAL). As a marker of kidney damage. *AM J Kidney* 2008; 52:595-605.
- Cowland J, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue of the gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from humans. *Genomics* 1997; 45:17-23.
- Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2007 [Epub] ahead the role of interleukin-18 in renal injury. *J Surg Res* 2008;145:170-5.
- Flower D, North A, Sansom C. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 9-24.
- Flower DR. The lipocalin family: structure and function. *Biochem* 1996; 318: 1-14.
- Friedl A, Stoesz S, Buckley P, Gould M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem* 1999; 31: 433-441.
- Goetz D, Holmes M, Borregaard N, Bluhm M, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002; 10:1033-1043.
- Kjeldsen L, Johnsen A, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993; 268:10425-10432.
- Mehta R, Kellum J, Shah S, et al. Acute kidney injury network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11:R31.

- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefers MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365:1231-1238.
- Mishra J, Kelly C, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol* 2006; 21:856-863.
- Monier F, Surla A, Guillot M, Morel F. Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients. *Clin chim Acta* 2000; 299: 11-23.
- Nielsen BS, Bundgaard N, Kjeldsen L, Bundgaard RJ, Timshel S, Sehested M. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 414-420.
- Ohlsson S, Weislander J, Segelmark M. Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:528-535.
- Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Edelstein CL, Devarajan P. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1639-1645.
- Schrier J, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004;114:5-14.
- Steven P, Stoesz S, Friedl A, Haag J, Lindstrom M, Clark G, Gould M. Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int J Cancer* 1998; 79: 565-572.
- Tong Z, Xuli W, Dmitriy O, Zhu J, Chen C, Kehrer J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *Biochem J* 2005; 391: 441-448.
- Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H. A 25 kDa 2-microglobulin-related protein is a component 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett.* 1992; 314:386-388.
- Uchino S, Kellum J, Bellomo R, Doig G, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; 294: 813-818.
- XU S, Paulsen K, Venge P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 150-153.
- Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 2001; 276: 37258-37625.

Corrispondenza a: Dr Rosanna Beneventi
U.O.S. Laboratorio di Urgenza,
Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza
via P. Petrone 85100 POTENZA
tel 0971 612385-613587
e-mail beneventisimel@libero.it

Pervenuto il 22/03/2011

IL CIOCCOLATO TRA STORIA E SCIENZA

ROBERTO VERNA

Quasi tutti, in particolare i bambini, amano il cioccolato. Ma cosa ne sappiamo veramente? Oltre al sapore gustoso, conosciamo le sue origini, l'evoluzione e le proprietà? In questa relazione cercherò di dare alcune informazioni utili su come usarlo.

Dall'albero al cioccolato.

L'albero del cacao cresce nella fascia tropicale, tra 10 e 20 gradi a nord e a sud dell'equatore, nella zona chiamata anche "la cintura del cacao". L'albero del cacao può essere molto alto e giungere fino a 12 metri. Il cacao comincia a dare i suoi frutti dopo circa 5 anni, ma ce ne vogliono 10 per fornire prestazioni ottimali.

I suoi frutti, chiamati baccelli o cabossidi, possono assumere un colore che va dal marrone/giallo al viola, e contengono da 20 a 40 semi o fave di cacao. Ogni pianta produce da 20 a 50 cabossidi all'anno e sono necessari circa dieci cabossidi per produrre un chilo di cacao (figura 1, a, b).

Il sapore dei semi di cacao dipende non solo dalla varietà della pianta, ma anche dal terreno, dalla temperatura, dalla luce del sole e dalla pioggia.

Dopo un processo di fermentazione e di essiccazione al sole, le fave di cacao vengono confezionate per il consumo locale o per essere inviate ai produttori di cacao e cioccolato. Prima di venire trasformati in cacao o cioccolato, i semi vengono arrostiti e assumono il caratteristico colore del cacao. Infine, dai semi tostati vengono rimossi i gusci; segue il processo di rettifica che rende la grana più fine. L'alta tempera-

tura genera un liquore di cacao e successivamente, con calore e pressione aggiuntiva, si ottengono burro di cacao e cacao in polvere. Per arrivare a una consistenza molto setosa, va messo in atto un lungo processo di miscelazione e riscaldamento.

Le origini: Maya e Aztechi.

Le origini del cioccolato sono molto antiche e sono di solito fatte risalire al periodo Maya, che sono stati probabilmente i primi a coltivare la pianta del cacao, nel 400 dC.

La pianta che conosciamo oggi è il risultato di incroci e di selezione che erano già stati iniziati 35.000 anni fa. Il consumo di cacao era diverso da quello che è oggi: le fave di cacao una volta essiccate venivano macinate e disciolte in acqua, con l'aggiunta di cannella e pepe per esaltarne il sapore, decisamente amaro e forte. La bevanda prese il nome di xocolatl. Si può dedurre che la bevanda fu apprezzata più per i suoi effetti tonificanti e stimolanti, ben noti agli antichi utilizzatori, che per il gusto.

Quando, nel 1200, iniziò la dominazione Azteca sui Maya, la bevanda venne particolarmente apprezzata dall'imperatore Montezuma, che si dice ne consumasse decine di tazze al giorno (Figura 2). I semi di cacao sono stati considerati un bene prezioso, al punto da essere utilizzati come moneta ed essere conservati nei forzieri con oro e preziosi.

Secondo antiche leggende, gli Aztechi credevano che il dio Quetzalcoatl fosse giunto sulla Terra viaggiando sui raggi di luce della stella del mattino portando con sé dal cielo l'albero di cacao per offrirlo agli uomini. Gli uomini impararono da Quetzalcoatl come tostare e macinare i semi, ottenendo così una pasta nutriente, solubile in acqua. Aggiunsero le spezie ed ottennero la bevanda che venne chiamata "tsocolatl" o "acqua amara" credendo che conferisse loro la saggezza e la conoscenza universale.

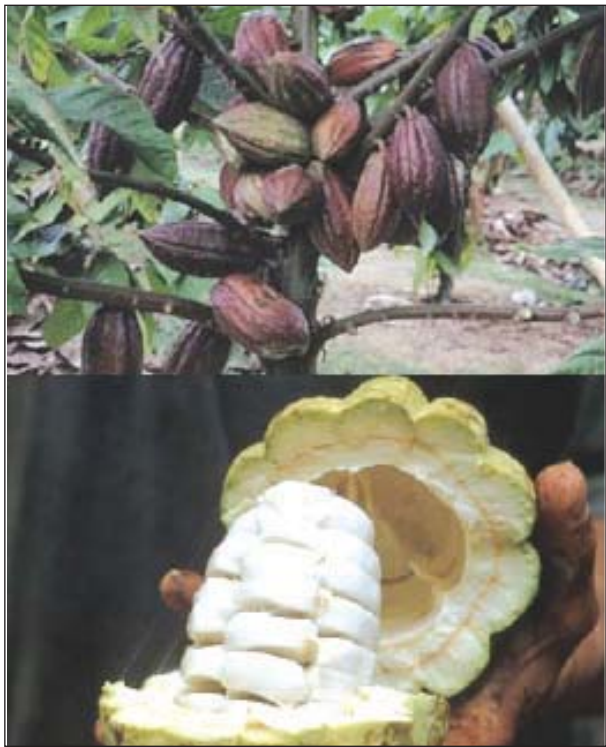


Fig. 1. a) albero del cacao; b) cabosside.



Fig. 2. Montezuma assapora la cioccolata.

La bevanda degli dèi.

Le origini mitologiche (ma i vincitori scrivono sempre la storia nel modo che preferiscono) narrano che il cacao era stato originato dal sacrificio di una principessa azteca, che era stata uccisa dal nemico per non aver rivelato dove erano conservate le ricchezze del regno. Dal sangue della principessa sarebbe spuntata la delicata pianta del cacao, con significati mistici e proprietà afrodisiache, che dette origine ad una bevanda per sacerdoti e guerrieri (Figura 3 a, b). Oggi la pianta del cacao è coltivata in molti paesi, soprattutto in Costa d'Avorio, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasile, Camerun, Ecuador, Repubblica Dominicana e in Papua Nuova Guinea. Altri paesi in cui viene coltivata sono Madagascar, Malesia, Messico, alcune isole dei Caraibi, come Granada e Cuba e alcune isole del Pacifico come Samoa.

Nel 1502, si è verificato il primo incontro della civiltà occidentale con il cacao: Cristoforo Colombo sbarcò sull'isola di Guanaja, Honduras, e ricevette il dono di una tazza di cioccolato (Figura 4). Cristoforo Colombo prima, Cortes poi, scoprirono nelle Americhe la pianta del cacao, ma solo Cortes portò i semi in Europa (Figura 5). Da questo momento in poi, a causa di frequenti scambi commerciali con le colonie americane della Spagna, il cioccolato cominciò ad essere introdotto nel vecchio continente, sempre consumato solo come bevanda.

In un primo momento gli spagnoli seguirono la ricetta

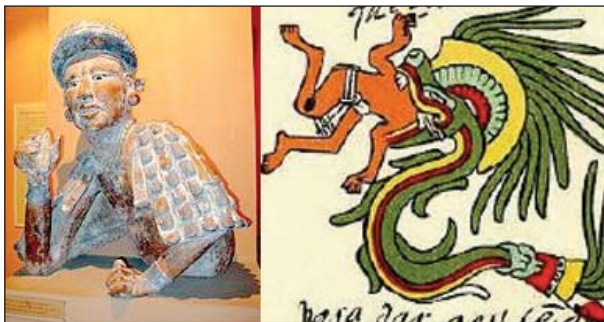


Fig. 3. a) un antico sacerdote; b) Quetzalcoatl, il serpente piumato.

degli Aztechi, con ulteriore aggiunta di peperoncino e spezie; dopo che venne aggiunto zucchero, cannella e vaniglia, il gusto del cacao divenne più dolce e morbido. Importato dalle Americhe nelle corti europee in versione addolcita rispetto alla bevanda originale, forte e piccante, il cacao si diffuse inizialmente come medicinale e stimolante.

Elaboriamo ora una sintesi cronologica del primo cioccolato, da valuta commerciale a colazione per i bambini (Tab.I).

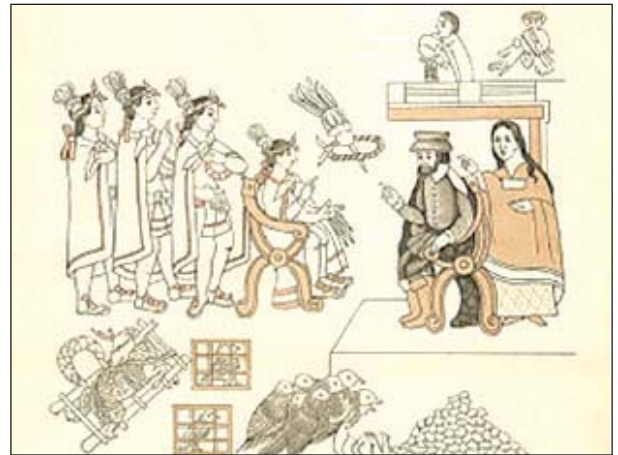


Fig. 4. Colombo e Montezuma.



Fig. 5. Cortès.

Cioccolato liquido, amaro e piccante	
300-900 A.D	La civiltà Maya scioglie il cacao in una bevanda amara, probabilmente mangiandolo caldo con il mais
Cioccolato liquido, amaro e freddo	
1375-1521	La civiltà degli Aztechi usa cacao fuso in una bevanda amara, probabilmente solo a freddo, con spezie
1565	Viene pubblicata a Venezia la "Historia del Mondo Nuovo" dal viaggiatore italiano Girolamo Benzoni, che giudica la cacaute amaro come "cibo più per i suini di esseri umani"
Cioccolato liquido, dolce e caldo	
1585	A Oaxaca, in Messico, le suore di un convento mescolano lo zucchero e il cacao e si comincia a mangiarlo sempre liquido, ma caldo e dolce

Tabella I. Cronologia del cioccolato.

Importato dalle Americhe nelle corti europee in versione addolcita rispetto alla forte e piccante bevanda originale, il cacao si diffonde inizialmente come medicinale e stimolante. A partire dal 1660, la colata di cioccolata calda e dolce diffonde in tutta Europa: Belgio, Germania e Svizzera, ma anche in Austria e in Italia. I maestri veneziani e fiorentini che danno vita all'arte della preparazione del cioccolato. In Inghilterra viene costituita la Chocolate House per le classi più abbienti.

Nel 1662, il cardinale Brancaccio stabilisce che la cioccolata calda non rompe il periodo di digiuno, consentendo la diffusione della bevanda nei monasteri e nelle corti europee.

Nel 1753 il naturalista svedese Carl von Linné classifica l'albero del cacao come *Theobroma cacao*: cibo degli dei.

Dal 1750-1790 l'Arcadia dedica la sua attenzione al

cioccolato con rime poetiche di Metastasio, Baruffaldi, Parini, ma la vera consacrazione della bevanda avviene, tuttavia, solo dopo la metà del XVIII secolo, in Francia, diventando di moda presso l'aristocrazia europea (Tab. II).

NOTA. Il processo di concaggio consiste nel mescolare vari ingredienti come latte, vaniglia, burro di cacao supplementare, per tempi molto lunghi (da 12 a 48 ore) a temperatura controllata per mantenere la miscela liquida. Dopo questa fase, il cioccolato viene sciolto in vasche mantenute a 45-50°C (figura 6 a, b).

Il cioccolato nell'arte.

Il tema del cioccolato è stato affrontato più volte dalla settima arte, il cinema. I film sono: *Chocolat*, *Come l'acqua per il cioccolato*, *Cioccolata calda*, *La fabbrica di cioccolato*, *Lezioni di cioccolato*; *Bianca*

1815	Conread Van Houten di Amsterdam isola il burro di cacao dalla massa di cacao
1847	Fry inventa la prima tavoletta di cioccolato solido con fave di cacao, zucchero e burro di cacao
1865	Inizia la produzione di pasta gianduja a Torino, da un'idea di Michele Prochet e Isidore Caffarel
1875	Nasce il cioccolato al latte, inventato dallo svizzero Daniel Peter con latte condensato in polvere Henry Nestlé
1879	Rudolph Lindt nella sua fabbrica in Svizzera produce la prima tavoletta di cioccolato fondente, grazie al "concaggio" (Vedi nota a fine tabella)
1832	Franz Sacher a Vienna inventa la sua famosa torta
1875	Fry crea la barra di cioccolato riempito con il nome di menta cioccolato
1900	Si affermano le fabbriche di cioccolato svizzero: Lindt & Sprüngli, Tobler, Suchard. Il cioccolato al latte diventa un cibo per tutti
1905	Cadbury produce il "Dairy Milk"
1907	Hershey in America inventa i "Baci"
1914	In Francia appare "Banania": polvere di cacao, zucchero e banane tritate
1922	Buitoni in Italia comincia a produrre il "Bacio"
1923	Negli Stati Uniti Frank Mars inventa la "Milky Way - Via Lattea"
1925	Callebaut produce la prima copertura di cioccolato
1925	A New York, viene istituita la Borsa di cacao, che controlla la materia prima e gli Stati Uniti diventano attori mondiali nella produzione di cioccolato
1943/5	Le truppe americane in Europa distribuiscono a tutti tavolette di cioccolato
1950-1975	In Francia vengono fondate prima la Valrhona (1950), poi la Maison du Chocolat di Robert Linxe. Rinasce la supremazia francese del cioccolato di qualità
1956	Nascita del "Mon Cheri", il primo boero prodotto industrialmente
1963	Rud Läderach nel laboratorio di Ennetbühl inventa la tecnica del "vuoto" prestampato per praline
1964	Il 20 aprile, esce il primo vasetto di Nutella
1974	Arrivano gli "Ovetti Kinder"
1984	Raymond Bonnat, della Voiron, crea la prima collezione del "Grands Crus de Cacao" nero
1988	Valrhona Guanaja realizza il primo bastoncino, un cru di cioccolato
1989	Lindt distribuisce nei supermercati italiani la tavoletta al 70% di cacao
1993-1995	Primo Salon du Chocolat di Parigi, prima edizione di Eurochocolate a Perugia
1998-2000	Amadei e Domori distribuiscono in Italia le tavolette da crus

Tabella II. L'evoluzione del settore del cioccolato.

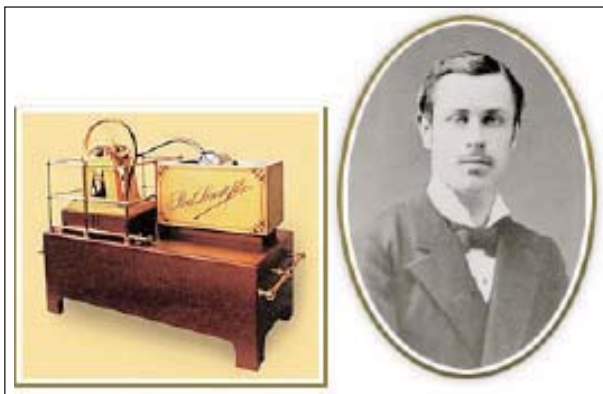


Fig. 6. a) la macchina per il concaggio; b) Rudolph Lindt.



Fig. 9. Jean Etienne Liotard. La cioccolataia.



Fig. 7. a,b,c,d,e,f Manifesti dei film sul tema del cioccolato.



Fig. 8. a,b,c,d,e Oggetti artistici di cioccolato.

(Figura 7a, b, c, d, e, f). L'arte è però anche la trasformazione di un materiale insolito (cioccolato) per generare particolari forme (figura 8a, b, c, d, e). La principale rappresentazione pittorica è di Jean Étienne Liotard, "La bella cioccolataia" (Figura 9). Giancarlo Bononi e Michel Mandurino combinano il tema di Caravaggio con quello del Cioccoshow, per una mostra fotografica (Figura 10).



Fig. 10. Lo stile di Caravaggio nel cioccolato.

Le varietà di cioccolato.

Fondente. È il più prezioso. Dal profumo intenso e persistente di cacao e cercando luminoso e brillante, si scioglie in bocca lasciando un grano piacevolmente amarognolo. È liscio al tatto, setoso, non granuloso. La percentuale di cacao è una delle caratteristiche principali per determinare la sua qualità. I migliori contengono almeno il 70% di cacao.

Gianduja. Di colore marrone, deriva dall'unione di nocciole, cacao e zucchero. È possibile l'aggiunta di latte, mandorle o noci. Il Gianduja nasce a Torino nella metà del XIX secolo.

Al latte. Contiene non meno del 20-25% di cacao,

oltre al burro di cacao, zucchero, latte in polvere e lecitina. Un buon cioccolato al latte deve avere un aspetto lucido. Il profumo deve essere intenso e persistente. Deve sentirsi prima il profumo della vaniglia e del latte, ma successivamente il cacao deve prevalere. Un buon cioccolato al latte è croccante e leggermente pastoso; deve sciogliersi rapidamente in bocca. Infine, il gusto dovrebbe essere dolce con una leggera nota amara dovuta al cacao.

Bianco. Contiene burro di cacao, zucchero, latte in polvere e vaniglia. Ha un sapore dolce e piacevole e può essere utilizzato tra l'altro per preparare mousse, panna e altri dolci (Figura 11). Oltre al piacere del palato, il cioccolato è utilizzato anche per altri usi, come quelli cosmetici, a causa delle proprietà del burro di cacao (Figura 12).

Il cioccolato nella Scienza e nella Salute.

Finora abbiamo tracciato i punti salienti della storia del cioccolato, ma non dimentichiamo la scienza e analizziamo le questioni legate alla salute.

Le proprietà chimiche e fisiche

Sono legate al burro di cacao, di colore giallo (Figura 13), composto da tre trigliceridi monoinsaturi: POP (20%), POST (40%) e StOSt (25%) (Figura 14) e altri contenenti acido linolenico e acido arachidonico (Davis TH e PS Dimick, J Amer Oil Chem Soc, 1989). Fragile al di sotto 20°C, morbido tra 30-32°C, fonde a una temperatura appena inferiore a



Fig. 11. Varietà di cioccolato.



Fig. 12. Usi alternativi del cioccolato.

quella corporea. Ha proprietà nutritive eccezionali per la pelle. Puro, lenisce e idrata.

Altre fonti di trigliceridi sono: burro d'illipe, sego del Borneo (o Tengkawang Shorea spp) (Figura 15); olio di palma (Eiaeis guineensis, Eiaeis olifera), grasso e stearina di Shorea robusta, burro di karité (Butyrospermum parkii), burro di Cocum (Garcinia indica), nocciolo di mango (Mangifera indica). Nel cioccolato che viene utilizzato per la preparazione



Fig. 13. Burro di cacao.

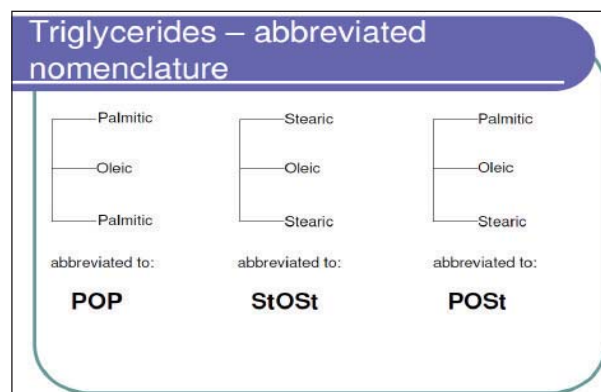


Fig. 14. Trigliceridi presenti nel cioccolato.



Fig. 15. Shorea spp. (origine del burro di illipe).

di gelato e simili prodotti surgelati, è consentito l'impiego di olio di cocco. Ma il valore nutritivo non è lo stesso.

Il valore energetico

Cioccolato puro = 2.080 kilojoule (kJ) o 495 chilocalorie (kcal) Cioccolato al latte = 2.160 kilojoule (kJ) o 515 chilocalorie (kcal) Cioccolato bianco = 2.260 kilojoule (kJ) o 540 chilocalorie (kcal)

Le molecole del cioccolato

Flavonoidi. Antiossidanti che agiscono contro l'invecchiamento (non presenti nel cioccolato bianco). Burro di cacao. Proprietà nutrizionali eccezionali per la pelle. Puro, lenisce e idrata anche la pelle più secca e screpolata.

Magnesio. Stimola la crescita delle cellule della pelle. Tonifica e migliora l'umore. Caffeina. Stimola e tonifica la pelle.

Teobromina. Stimola il muscolo cardiaco ed il sistema nervoso. Si trova in maggiore quantità nel cioccolato fondente.

Prodotto del cacao	Mg/g
Semi di cacao	14-53
Cioccolato puro	16
Cioccolato semidolce	9
Cioccolato al latte	2
Ciocolata calda	0.4
Ciocolata bianca	0.05

Tabella IV. Concentrazione di teobromina nelle diverse varietà di cioccolato.

Feniletilamina. Stimola il buonumore. Si trova nel cervello degli innamorati!

La combinazione di queste tre sostanze fa pensare che il cioccolato sia un dolce afrodisiaco, oltre ad essere utilizzato come componente base di molti cosmetici.

La teobromina è la molecola con il maggiore impatto farmacologico, con una concentrazione diversa a seconda delle diverse varietà di cioccolato.

Insieme con caffeina e teofillina costituisce le metilxantine (Figura 16), note per potenziare l'azione

	Fondente	Al latte	Bianco
Proteine	3.2	7.6	7.5
Lipidi	33.2	33.3	37
Carboidrati	60.3	57	52
Lecitina pura	0.3	0.3	0.3
Teobromina	0.6	0.2	/
Ca	20	220	250
Mg	80	50	30
P	130	210	200
Fe	2	0.8	Tracce
Cu	0.7	0.4	Tracce
Vitamina A (IU)	40	300	220
Vitamina B1 (mg)	0.06	0.1	0.1
Vitamina B2 (mg)	0.06	0.3	0.4
Vitamina C (mg)	1.14	3	3
Vitamina D (IU)	50	70	15
Vitamina E (mg)	2.4	1.2	Tracce
Kcal	495,2	514,2	538

Tabella III. La composizione delle varietà di cioccolato.

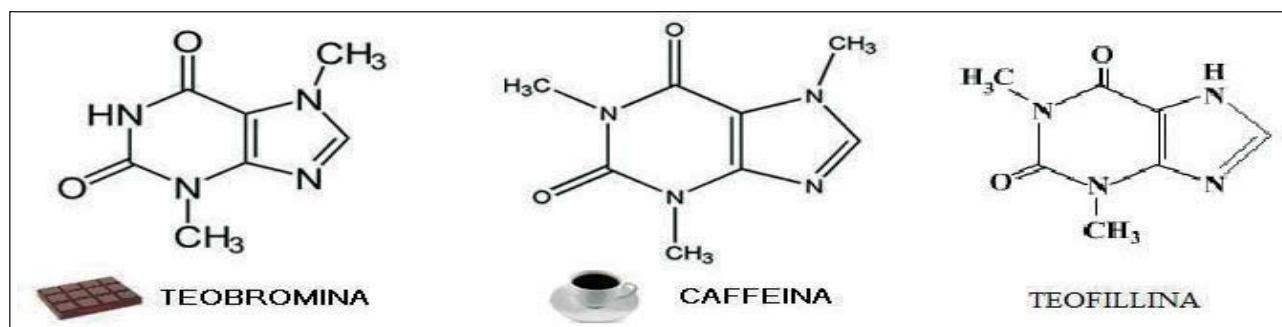


Fig. 16. Le metilxantine.

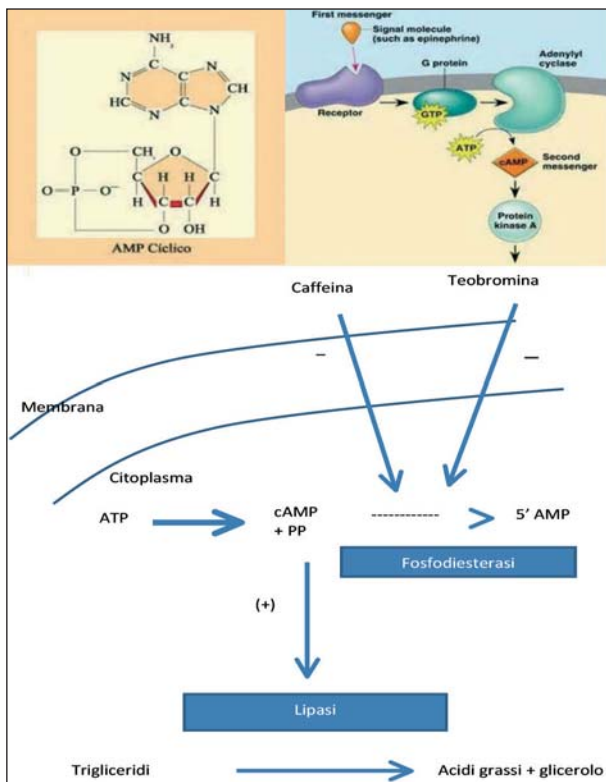


Fig. 17. Il meccanismo d'azione del cAMP.



Fig. 18. Earl W. Sutherland (nel quadro), Michael Laposata (avanti), Roberto Verna (dietro).



Fig. 19. Alcuni famosi "cyclers". Dall'alto a sinistra: Paul Greengard, Ira Pastan, Martin Rodbell, Pedro Cuatrecasas, Michael Gottesman.

del cAMP. Infatti, esse inibiscono la fosfodiesterasi che idrolizza il cAMP a 5'AMP.

Earl Wilbur Sutherland è stato il primo a identificare il ruolo del cAMP (Figura 17), ed è stato insignito del Premio Nobel nel 1971. Sutherland (Figura 18), oltre ad influenzare le mie scelte scientifiche, ha dato il via ad un ventennio di grande entusiasmo scientifico e ad una generazione di scienziati che ha dedicato gran parte della sua vita allo studio scientifico della trasmissione dei segnali intracellulari, che io definito “cyclers”: Paul Greengard, Martin Rodbell, Pedro Cuatrecasas, Ira Pastan, Michael Gottesman, i primi due anche insigniti del Premio Nobel (Figura 19).

Il cioccolato contiene anche sostanze psicoattive (Tabella 5).

Sostanza	Azione
Dopamina	Molte sostanze che producono piacere innescano il rilascio di questo trasmettitore nel sistema limbico: eroina, cocaina, alcol, nicotina.
Serotonina	Controlla l'umore e dà l'effetto “antidepressivo” del cioccolato.
Anandamide	È un lipide (da una parola sanscrita che significa felicità). Presente nel cervello come sostanza endogena, sarebbe in grado di interagire con i recettori dei cannabinoidi.
Feniletilamina	Neurotrasmettitore responsabile dello stato d'animo e del piacere. Produce un effetto stimolante.

Tabella V. Sostanze psicoattive presenti nel cioccolato.

Anti infiammatoria
Anti diabetica e anti obesità
Cardioprotettiva
Migliora le funzioni epatiche
Neuroprotettiva
Migliora la flora intestinale
Riduce gli ormoni dello stress
Riduce i sintomi del glaucoma e della cataratta
Riduce la progressione della paradontite

Tabella VI. Principali proprietà dei semi di cacao benefiche per la salute. (studies published on: <http://www.greenmedinfo.com/substance/chocolate>).

Gli effetti benefici del cioccolato (Tabelle 6 e 7) sono in relazione alle componenti naturali dei semi di cacao, compresi l'epicatechina e il esveratrolo, due potenti antiossidanti.

La vasodilatazione è il risultato dell'azione dell'Ossido Nitrico derivato dall'endotelio. NO è una molecola pluripotente con effetti diversi. Il principale stimolo fisiologico per la sintesi di ossido nitrico endoteliale è l'attrito del flusso di sangue sulla superficie del vaso, un processo chiamato “vasodilatazione flusso-mediata-FMD” (Figura 20). Inoltre, una varietà di agonisti come acetilcolina, istamina, trombi-

Aumentano la resistenza capillare
Diminuiscono la permeabilità dei vasi
Anti infiammatori
Anti allergici
Antivirali
Antiaterogenici
Antiarritmici
Antitumorali
Antiepatotossici
Immunostimulanti
Ipolipemizzanti
Modulazione dell'attività degli estrogeni
Aumentano la biodisponibilità dell'ossido nitrico, la cui azione migliora la pressione, la funzionalità piastrinica ed aumenta la fluidità del sangue

Tabella VII. Gli effetti benefici dei flavonoidi.

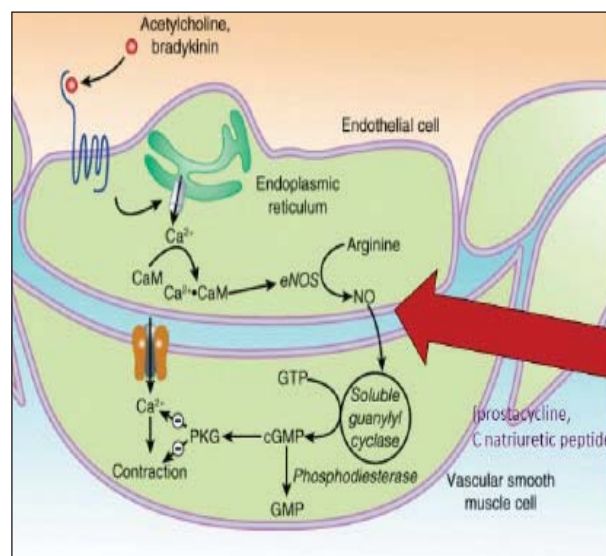


Fig. 20. Vasodilatazione mediata da NO; modificata da Katzung et al.

na, serotonina, adenosina difosfato (ADP), bradichinina e noradrenalina causano vasodilatazione quando l'endotelio è intatto e vasocostrizione se l'endotelio viene rimosso o è disfunzionale. Infine, l'ossido nitrico mostra molti altri effetti, come l'inibizione dell'adesione piastrinica e un effetto che può essere sinergico a quello della prostaciclina; la riduzione dell'espressione del fattore tissutale indotta da endotossina e citochine, il potenziale protrombotico delle cellule endoteliali e l'inibizione dell'adesione dei monociti all'endotelio (Figura 21).

Luis Ignarro, che è stato anche premiato con il Premio Nobel, ha definito il ruolo del NO nella erezione maschile. Dai suoi studi, è emerso che è possibile migliorare l'erezione con farmaci contenenti molecole che inibiscono la fosfodiesterasi (Figura 22).

Dato che il cioccolato ha lo stesso meccanismo di inibizione della fosfodiesterasi, forse un'assunzione adeguata di cioccolato potrebbe essere utilizzata anche per questo scopo (Figura 23).

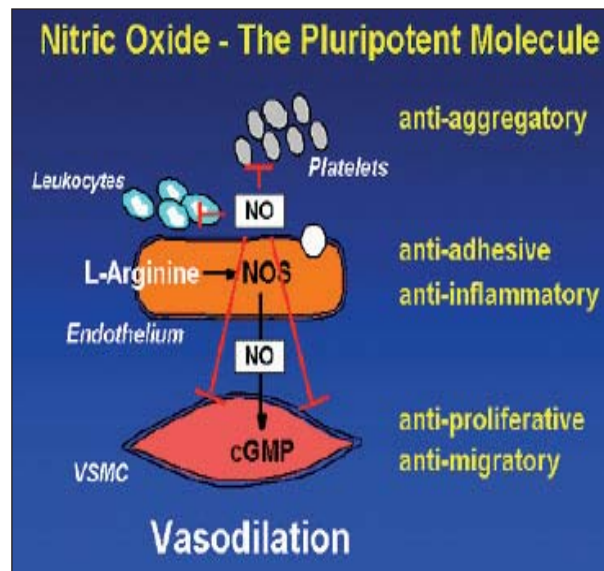


Fig. 21. NO, la molecola pluripotente.

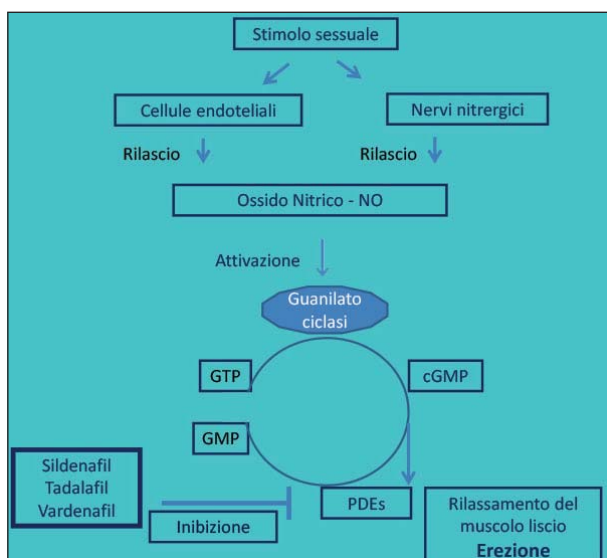


Fig. 22. Il meccanismo dell'erezione.



Fig. 23. Il cioccolato si mangia per il sapore o.....

INSTRUCTION TO AUTHORS

Policy

Il Patologo Clinico Journal of Molecular and Clinical Pathology - is a journal that covers all aspects of Clinical Pathology and Laboratory Medicine. Diagnostic and research areas covered include Molecular Medicine and Immunohematology, Histopathology, Virology and Microbiology, Forensic Medicine, Clinical Research and Clinical Governance. Each issue contains Reviews, Original articles, Short reports, Case reports, Correspondence, Book reviews and more. JMCP has Editorial Board members from all around the world to ensure coverage of global research. Papers accepted for publication should be original research articles; reviews, case reports, general laboratory policy articles are also accepted. Articles should be written in English, but also articles written in Italian are acceptable, if they respond to the journal prerequisites.

Articles submitted to the journal will be peer reviewed by two referees before being admitted to publication.

No charge will be requested to authors for publication, but reprints are not free: they should be ordered at the moment of the acceptance for publication and paid by the Authors.

Il Patologo Clinico Journal of Molecular and Clinical Pathology is the official issue of the Italian Association of Clinical Pathology and Molecular Medicine (AIPaCMeM) and is under the Patronage of the World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM).

How to submit papers

On submitting papers, authors state that their research is original or, in case of reviews, that they have accurately controlled the source of the information. Manuscripts should be sent by e-mail to segreteria@aipacmem.it together with an original printed copy sent to AIPaCMeM – Via Luigi Ungarelli 23 – 00162 Roma.

The Journal will not publish articles without the informatic version. Scientific manuscripts should be limited to no more than ten pages, including abstract, text, bibliography, illustrations or tables. Please take note that one page of the Journal contains, without tables or illustrations, 5000 characters total; so, the total characters should be not more than 50.000, including the white spaces.

All the articles, English or Italian must be preceded by an abstract (max 200 words). The articles must include the following sections: a) title page, b) summary, c) introduction, d) materials and methods e) results f) discussion, g) references. It is possible, in case of short papers, to join the two parts e) results and f) discussion in only one: results and discussion.

The title page must contain the title of the paper and the complete names and family names of all the authors, their affiliation and the name and address of the corresponding author. Tables should be inserted in the text. Illustrations must be sent on a file separated from the text (use Power Point or Adobe Photoshop) but must be indicated where they should be located in the text.

References should contain the name of all the authors, the title of the article, the name of the Journal in italics, the year of publication, the number of the Journal, the first and the last page divided by hyphen, following the model of the National Library of Medicine – PubMed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (e.g. Rossi A, Bianchi E, Verdi C, Neri M. Anemie emolitiche. *Il Patologo Clinico* 1988; 8, 23-26).

References must be mentioned in the text in brackets with only the last name of the author and the year. If the authors are two, mention the two last names; if there are more than two authors, mention only the first followed by et al, and the year (E.g. Rossi, 1998) or (Rossi and Bianchi, 1998) or (Rossi et al, 1998).

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Politica

Il Patologo Clinico Journal of Molecular and Clinical Pathology - è un giornale che copre tutti i campi della Patologia Clinica e della Medicina di Laboratorio. Le aree diagnostiche e di ricerca trattate comprendono Medicina Molecolare e Immunoematologia, Istopatologia, Virologia e Microbiologia, Medicina Forense, Ricerca Clinica e Governance Clinica. Ciascun numero contiene Rassegne, Articoli Originali, Brevi reports, Case reports, Corrispondenza, Resoconti su libri ed altro. Il JMCP ha un comitato editoriale internazionale per assicurare la copertura globale della ricerca. Gli articoli dovrebbero essere scritti in inglese, ma anche lavori scritti in italiano possono essere accettati, se rispondono ai requisiti del Journal. I manoscritti proposti per la pubblicazione verranno rivisti da due referee del settore prima di essere ammessi alla pubblicazione. La pubblicazione è gratuita ma i reprint non sono gratuiti: è necessario richiederli al momento dell'accettazione del lavoro indicando la forma di pagamento prescelta.

Il Patologo Clinico Journal of Molecular and Clinical Pathology è l'organo ufficiale dell'Associazione Italiana di Patologia Clinica e Medicina Molecolare ed ha il patrocinio della World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM).

Come sottoporre i manoscritti

Con la proposta del manoscritto, gli autori sottintendono la dichiarazione che la loro ricerca è originale o, nel caso di reviews, che la provenienza delle informazioni è stata accuratamente controllata. I manoscritti debbono essere inviati per e-mail all'indirizzo segreteria@aipacmem.it insieme ad una copia a stampa inviata a: AIPaCMeM - Via Luigi Ungarelli 23 - 00162 Roma. Il giornale non pubblicherà articoli sprovvisti della versione informatica. La lunghezza dei manoscritti non dovrebbe superare le dieci pagine, includendo abstract, testo, bibliografia, illustrazioni e tavole. Si consideri che una pagina della Rivista contiene, senza tavole o illustrazioni, 5000 caratteri; così che il totale dei caratteri non dovrebbe superare i 50000, inclusi gli spazi bianchi.

Tutti gli articoli, sia in italiano che in inglese debbono essere preceduti da un abstract in inglese (max. 200 parole). Gli articoli devono essere suddivisi nelle seguenti sezioni: a) introduzione, b) materiali e metodi, c) risultati, d) discussione, e) bibliografia. È possibile, in caso di lavori brevi, riunire le due parti c) risultati e d) discussione in una unica parte: risultati e discussione.

Le tabelle debbono essere inserite nel testo. Le illustrazioni debbono essere inviate a parte (usare Power Point o Adobe Photoshop) ma va indicato dove dovrebbero essere inserite nel testo.

Nella sezione Referenze (o Bibliografia) le referenze debbono contenere il nome di tutti gli autori (il cognome e l'iniziale del nome, dividendo un autore dall'altro con la virgola), il titolo del lavoro, *il nome della rivista in corsivo* seguito da un punto, l'anno di pubblicazione, il numero della rivista, la prima e l'ultima pagina divise da un trattino, secondo il modello National Library of Medicine - PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>) (esempio: Rossi A, Bianchi E, Verdi C, Neri M. Anemie emolitiche. *Il Patologo Clinico*. 1988, 8, 23-26). Le referenze debbono essere elencate in ordine alfabetico, senza numerazione.

Nel testo va citato il cognome, seguito da una virgola e l'anno di pubblicazione, se l'autore è uno; se gli autori sono due, citare entrambi i cognomi poi la virgola e l'anno; se sono più di due, citare il primo cognome e quindi et al, e l'anno. Se gli autori sono due, menzionare i due cognomi; se sono più di due, menzionare il primo seguito da et al (es. Rossi, 1999) oppure (Rossi e Bianchi, 1999); (Rossi et al, 1999).



Associazione Italiana
di Patologia Clinica
e Medicina Molecolare

Secondo Congresso dell'Area di Patologia e Diagnostica di laboratorio



American Society for
Investigative Pathology



Società Italiana di
Patologia e Medicina
Trasfusionale



64° Congresso Nazionale AIPaCMeM

32° Congresso Nazionale SIPMeT

Meccanismi Molecolari di Malattia: dalla ricerca di base alla pratica clinica

Molecular Mechanisms of Disease:
from basic research
to clinical practice



Palermo 2014

17-19 settembre
Astoria Palace Hotel

