

---

---

# BC

---

---

## biochimica clinica

**In questo numero:**

**TEMI ETICI IN MEDICINA DI LABORATORIO**  
*vedi pag. 105, 176, 196*

**IL PERCORSO DI FORMAZIONE EUROPEO**  
*vedi pag. 107 e pag. 211*



SIBioC - Medicina di Laboratorio  
membro di

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



# Chemiluminescenza a Flash con Marcatura ABEI e Separazione con Microsferette Nanomagnetiche



Maglumi 800  
180T/H



Maglumi 600  
180T/H



Maglumi X8  
600T/H



Maglumi 2000 Plus  
180T/H



Maglumi 4000 Plus  
280T/H



Maglumi 2000  
180T/H

Analizzatori per la completa  
Automazione di Immunodosaggi  
in Chemiluminescenza (CLIA)

# sommario



## EDITORIALI

105

Temi etici in Medicina di Laboratorio  
*MS. Graziani*

107

Il percorso comune europeo per la formazione degli specialisti in Medicina di Laboratorio: un traguardo sempre più vicino  
*M. Ciaccio, MS. Graziani*

## RASSEGNE

109

Il microbiota umano: il buono, il brutto e il cattivo  
*I. Veneruso, R. Tomaiuolo, F. Cariatì, V. D'Argenio*

123

Emoglobinopatie: quadri clinici e ruolo del laboratorio tra realtà e prospettive future  
*G. Ivaldi, G. Barberio, MD. Cappellini*

## CONTRIBUTI SCIENTIFICI

141

Comparison of Albumin-Bilirubin grade with Child-Pugh and Model for End Stage Liver Disease scores in chronic liver disease  
*S. Rajaragupathy, J. Karthikeyan, L. Natarajan*

146

Valutazione degli anticorpi anti SARS-CoV-2 nell'ambito di un progetto di costituzione di una banca di plasma iperimmune  
*G. Gessoni, L. Moro, M. Orfano, M. Pivetta, R. Dittadi, M. Pacenti, G. De Silvestro*

153

Antibody identification in COVID-19 pandemic: a comparison between immunochemiluminescence and immunochromatography methods  
*R. Buonocore, M. Vidali, M. Cusini, P. De Corato, C. Melchionna, E. Galbiati, E. Berti, F. Ceriotti*

158

Modalità di refertazione del D-Dimero e prestazioni dei sistemi analitici: quali informazioni dal programma di Valutazione Esterna di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica  
*S. Secchiero, L. Sciacovelli, M. Plebani*

## OPINIONI

168

La Fibrosi Cistica: comorbidità, geni modificatori e medicina di precisione  
*M. Nunziato*

176

L'etica in medicina di laboratorio nella terza era della medicina  
*M. Plebani*

## DOCUMENTI

180

Glossario di epidemiologia  
*L. Zanolla, MS. Graziani*

196

Integrità della ricerca: comprendere la nostra comune responsabilità per un sistema accademico sostenibile  
*M. Szomszor, N. Quaderi*

---

# sommario

---

## DOCUMENTI SIBioC

**211**

Il Percorso Comune di Formazione per Specialisti in Medicina di Laboratorio secondo la Direttiva Europea 2013/55/EC (Il riconoscimento delle qualifiche professionali)

*G. Wieringa, J. Queraltó, E. Homšak, N. Jassam, E. Cavalier, D. Svinarov, J. L. Krleža, S. Christou, Ri. Pikner, T. Rennebod Larsen, K. Tomberg, A. Linko-Parvinen, V. Sapin, H. Baum, C. Kroupis, Z. Bagoly, S. Costelloe, L. Sciacovelli, J. Stasulans, D. Vitkus, D. Meunier, B. Solnica, H. Reguengo, C. Mambet, G. Kovac, B. Krhin, M. Ohlson, G. Buhagiar, AM. Simundic*

## CASI CLINICI

**e11**

Interferenza analitica sul conteggio dei leucociti

*T. Guastafierro, O. Costanza, C. Puliti, A. Di Nallo, E. Romeo, A. Marcucci, F. Bondanini, MG. Colace*

**e15**

Un caso di falsa neutropenia

*F. Serana, G. Martellosio, D. Tregambe, M. Lombardi, E. Cimpoies, M. Micheletti, M. Pinelli, L. Dotta, A. Soresina, A. Plebani, A. Beghin, A. Lanfranchi, E. Soncini, F. Porta, R. Badolato*

# biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti  
e già diretta da Carlo Franzini

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

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

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

#### Editor-in-Chief

Maria Stella Graziani

#### Deputy Director

Martina Zaninotto

#### Associate Editors

Ferruccio Ceriotti  
Davide Giavarina  
Bruna Lo Sasso  
Giampaolo Merlini  
Martina Montagnana  
Andrea Mosca  
Paola Pezzati  
Rossella Tomaiuolo  
Matteo Vidali

#### International Advisory Board

Khosrow Adeli *Canada*  
Sergio Bernardini *Italy*  
Marcello Ciaccio *Italy*  
Eleftherios Diamandis *Canada*  
Philippe Gillery *France*  
Kjell Grankvist *Sweden*  
Hans Jacobs *The Netherlands*  
Eric Kilpatrick *UK*  
Magdalena Krintus *Poland*  
Giuseppe Lippi *Italy*  
Mario Plebani *Italy*  
Sverre Sandberg *Norway*  
Ana-Maria Simundic *Croatia*  
Tommaso Trenti *Italy*  
Cas Weykamp *The Netherlands*  
Maria Willrich *USA*  
Paul Yip *Canada*

#### Editorial Secretary

Biomedica Editore  
biochimica.clinica@sibioc.it  
Biomedica srl  
Via L. Temolo 4  
20126 Milano  
Tel. 0245498282  
Fax 0245498199  
www.bc.sibioc.it

#### Responsible Editor

Giuseppe Agosta

#### Publisher

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

#### SIBioC Executive Board 2020-2021

Fiamma Balboni  
Umberto Basile  
Sergio Bernardini *Past President*  
Ciriaco Carru  
Giorgio Da Rin  
Giuseppe Lippi  
Martina Montagnana  
Gavino Napolitano  
Enza Pavanello  
Laura Sciacovelli *Presidente*  
Tommaso Trenti

#### Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

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



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

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

Autorizzazione del Tribunale di Milano  
n. 40 del 2.02.1987

#### Grafica e impaginazione

Biomedica srl  
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

#### Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl  
20040 Usmate (MI)

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

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

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

Associato all'USPI  
Unione Stampa  
Periodica Italiana  
Tiratura di questo  
numero 2000 copie  
2000 copies of this  
issue have been printed  
ISSN 0393-0564  
e-ISSN 0392-7091



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

## Volume 45

### Numero 2 - Giugno 2021

**SAVE THE DATE**

# 53<sup>o</sup> Congresso Nazionale SIBioC-Medicina di Laboratorio

LA MEDICINA DI LABORATORIO  
NELLA MEDICINA DI PROSSIMITÀ:  
telemedicina, ruoli e competenze

DIAGNOSE

MEDICAL CARE

Medicina di Laboratorio  
**SIBioC**

TREATMENT

ACCIDENT

11-13 OTTOBRE 2021  
**VIRTUAL EDITION**

un evento  
organizzato da



**BioMEDIA**  
La condivisione del sapere

<https://sibioc.congressonazionale.com>

## Temi etici in Medicina di Laboratorio

**Maria Stella Graziani**

Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

Il dizionario definisce l'etica professionale come l'insieme dei doveri strettamente inerenti alle attività professionali svolte nella società. La bioetica può essere definita come la branca dell'etica relativa alle questioni sociali, legali ed anche filosofiche legate alla pratica della Medicina umana. I comportamenti etici con i quali i Medici e tutti gli operatori sanitari in genere si devono confrontare abbracciano ogni area della Medicina, e la Medicina di Laboratorio non fa certo eccezione.

Il tema è di tale rilevanza per la professione che la EFLM ha ritenuto di inserire i temi etici nella stesura del Syllabus dedicato alla formazione post-laurea degli Specialisti Europei in Medicina di Laboratorio (1,2) e che la conoscenza e l'applicazione di un Codice di Condotta specifico per la professione è incluso nelle competenze richieste all'interno della definizione del Percorso comune per la formazione degli Specialisti in Medicina di Laboratorio della Comunità Europea (EU Directive 2013/55/EC) (3,4). Inoltre, la IFCC ha istituito una "Task Force on Ethics" che ha recentemente dedicato un intero numero del eJIFCC all'argomento (5). L'etica è anche inserita tra gli obiettivi formativi della Scuola di Specialità in Patologia Clinica e Biochimica Clinica (6,7) e nelle norme ISO 15189:2012 (Sezione 4.1.1.3) (8).

I temi etici relativi alla nostra disciplina sono molteplici. Includono certamente la necessità di porre sempre il Paziente al centro dei propri obiettivi operando affinché la qualità, l'efficacia e la sicurezza di ogni fase del processo (dalla raccolta dei campioni, all'esecuzione dell'esame, alla produzione di referti accurati ed esplicativi, alla conservazione dei campioni) possano assicurare al Paziente di ricevere la migliore assistenza possibile, ma spaziano dai principi etici da adottare per assicurare l'integrità della ricerca e delle pubblicazioni scientifiche che ne possono derivare, alla specifica attenzione da riservare agli esami eseguiti con tecniche di biologia molecolare (genetica e genomica), alle numerose possibilità che si generino conflitti di interesse (ad esempio con l'industria biomedica), e la loro corretta gestione.

Biochimica Clinica ha ritenuto opportuno dedicare uno spazio a queste tematiche, programmando alcuni contributi da pubblicare sui diversi fascicoli della rivista ad iniziare dal N 2 del 2021.

In questo fascicolo sono inseriti due articoli. Il primo, a cura di Mario Plebani (9), è una Opinione che ripercorre le tappe che in questi ultimi 20 anni hanno portato ad acquisire consapevolezza della centralità dell'etica in medicina di laboratorio. L'Autore esprime la convinzione, assolutamente condivisibile, che senza una "nuova visione etica" i sistemi sanitari attuali e, a maggior ragione, quelli che verranno disegnati per il futuro, mostrano e mostreranno tutti i loro limiti, come purtroppo abbiamo potuto drammaticamente tutti verificare nel corso di questa pandemia. Il pensiero dell'Autore è che debba essere la deontologia professionale e l'interesse primo della società e del singolo paziente a guidare le scelte e i comportamenti degli operatori sanitari e di tutti i "portatori di interesse" in Medicina. Questa visione comporta la necessità che sia indirizzato in tal senso uno sforzo collettivo e condiviso tra le "rappresentanze scientifiche" (come le definisce l'Autore) delle nostre comunità; per questo ritengo estremamente opportuno che il messaggio venga divulgato attraverso la rivista della nostra Società.

Il secondo articolo è la traduzione Italiana di un documento messo a disposizione dall'Institute of Scientific Information (Web of Science/Clarivate) che affronta i temi della integrità della ricerca e della sua diffusione (10). È parso particolarmente importante che questo tema specifico venisse affrontato tra i primi: una rivista scientifica è il mezzo deputato alla diffusione dei risultati della ricerca e l'integrità del processo editoriale è la base irrinunciabile perché questo avvenga in totale trasparenza e correttezza. Biochimica Clinica aderisce alle norme etiche del "Committee on Publication Ethics" (COPE, <http://publicationethics.org>), come si evince dalla Dichiarazione sull'etica

---

Corrispondenza a: Maria Stella Graziani, Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona. E-mail [mariastella@graziani.eu](mailto:mariastella@graziani.eu)

Ricevuto: 26.04.2021

Accettato: 26.04.2021

Pubblicato on-line: 14.05.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.034

che si trova sul sito della rivista. In base a queste norme, tutte le parti coinvolte nel processo di pubblicazione (Direttore, Editori Associati, Revisori, Autori, Casa Editrice, nonché eventuali Finanziatori) si impegnano all'adozione dei comportamenti etici descritti, assicurando così un processo editoriale corretto e imparziale. La numerosità sempre crescente delle riviste scientifiche sul mercato, rende la lettura di questo documento interessante non solo per gli Autori di *Biochimica Clinica*, ma anche per ogni suo lettore. Il processo editoriale e le diverse possibilità di inficiarne l'integrità sono infatti comuni ad ogni rivista scientifica; anzi, più la rivista è importante e accreditata a livello internazionale, tanto più sarà probabile che vengano messi in atto comportamenti più o meno eticamente scorretti, da un lato per favorire la pubblicazione di un proprio contributo e dall'altro per accrescere ulteriormente il prestigio della rivista stessa. Credo che la conoscenza delle diverse attività che possono essere messe in atto per minare l'integrità della ricerca, apporti consapevolezza e quindi sia da sprone nel miglioramento dei comportamenti di qualsiasi attore coinvolto nel processo di pubblicazione dei risultati.

In conclusione, mi auguro che questa iniziativa del giornale sia gradita ai suoi lettori, e che si possa tutti insieme procedere verso l'adozione di una più attenta etica professionale per il miglioramento della nostra disciplina, nell'interesse della comunità scientifica, e della salute di ogni singolo paziente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 – 2018. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1846-63.
2. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in Medicina di Laboratorio: versione n 5 (2018). Traduzione Italiana a cura di Cigoli MS e Lo Sasso B. *Biochim Clin* 2018;42:247-62.
3. Wieringa G, Queraltó J, Homšak E, et al. A proposed Common Training Framework for Specialists in Laboratory Medicine under EU Directive 2013/55/EC (The Recognition of Professional Qualifications). *Clin Chem Lab Med* 2021;59:505-12.
4. Wieringa G, Queraltó J, Homšak E, et al. Il Percorso Comune di Formazione per Specialisti in Medicina di Laboratorio secondo la Direttiva Europea 2013/55/EC (Il riconoscimento delle qualifiche professionali). Traduzione Italiana a cura di Turkman J e Zaupa P. *Biochim Clin* 2021;45:211-8.
5. AA.VV. Ethics in Laboratory Medicine. *eJIFCC* 2021;31:260-361.
6. Decreto Interministeriale n 68 del 4 febbraio 2015. Riordino scuole di specializzazione di area sanitaria. <http://attiministeriali.miur.it/anno-2015/febbraio/di-04022015.aspx>. (ultimo accesso: marzo 2021).
7. Decreto Interministeriale n 716 del 16 settembre 2016. Riordino delle Scuole di specializzazione ad accesso riservato ai "non medici". <http://attiministeriali.miur.it/anno-2016/settembre/di-16092016.aspx> (ultimo accesso: marzo 2021).
8. ISO/DIS 15189:2012. Quality management in the medical laboratory. International organisation for Standardisation: Geneva 2012.
9. Plebani M. L'etica in medicina di laboratorio nella terza era della medicina. *Biochim Clin* 2021;45:176-9
10. Szomszor M, Quaderi N. Integrità della ricerca: comprendere la nostra comune responsabilità per un sistema accademico sostenibile. Traduzione italiana a cura di F Biancalani. *Biochim Clin* 2021;45:196-210.

## Il percorso comune europeo per la formazione degli specialisti in Medicina di Laboratorio: un traguardo sempre più vicino

Marcello Ciaccio<sup>1</sup>, Maria Stella Graziani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata, Sezione di Biochimica Clinica, Medicina Molecolare Clinica e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Palermo

<sup>2</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

La Medicina di Laboratorio ha, oggi, un ruolo fondamentale in tutto il percorso clinico-assistenziale, dallo screening, alla diagnosi, alla prognosi ed al monitoraggio della malattia e della terapia; tale ruolo è ormai ampiamente riconosciuto a livello internazionale. La Medicina di Laboratorio rappresenta, infatti, una disciplina clinica, insostituibile nella medicina ospedaliera e territoriale, con un ruolo attivo accanto al Paziente.

Sono diverse le figure professionali che operano all'interno di un Laboratorio Clinico ed includono sia specialisti medici che non medici. In particolare, in quest'ultima categoria rientrano diverse figure professionali, quali laureati in Biologia, Tecniche di Laboratorio, Farmacia, Biotecnologie. Nei Laboratori dei vari Paesi dell'Unione Europea operano figure professionali diverse con competenze talvolta differenti. In particolare, nei Laboratori di alcuni Paesi, quali Austria, Germania, Grecia e Svezia, la maggior parte del personale dirigente è laureata in Medicina e Chirurgia, mentre in altri Paesi, quali Francia e Spagna, la laurea prevalente è in Farmacia. Pertanto, a livello europeo vi è un'elevata eterogeneità all'interno dei Laboratori Clinici ed è, quindi, fondamentale definire un percorso comune con un duplice scopo: di garantire a tutti i Pazienti che fanno parte dell'Unione Europea (UE) lo stesso livello di cura, e di favorire il riconoscimento dello "Specialista di Medicina di Laboratorio", così come definito dall'EFLM, su tutto il territorio europeo in modo da facilitarne lo spostamento all'interno dei vari Stati membri.

A tal fine la Direttiva europea 2013/55/EU per il riconoscimento delle qualifiche professionali ha proposto la definizione di un Percorso Comune di Formazione (*Common Training Framework*, CTF) per permettere a tutti i Professionisti della Medicina di Laboratorio di acquisire conoscenze, capacità e competenze comuni (*Equivalence of Standards*) che possano essere riconosciute in tutti i Paesi dell'UE (1,2). Il CTF consentirà, quindi, il riconoscimento dello Specialista di Medicina di Laboratorio a livello europeo, facilitando così l'esercizio della professione in tutti gli Stati membri, senza necessità di ulteriori percorsi integrativi di formazione per gli specialisti che intendono svolgere la professione in un Paese diverso da quello dove è avvenuto il loro percorso educativo e formativo.

EFLM, in qualità di rappresentante degli interessi professionali degli Specialisti in Medicina di Laboratorio a livello europeo, ha un ruolo attivo nel promuovere iniziative per definire un quadro di formazione di alta qualità comune, ai sensi della Direttiva UE 2013/55/CE (1).

Infatti, EFLM promuove da diversi anni il progetto di creare una figura dello Specialista di Laboratorio che possa essere riconosciuta a livello europeo. Tale progetto è iniziato con la stesura del Syllabus, che adesso è giunto alla Va versione (3), e ha proseguito con la redazione del "Register of Specialists in Laboratory Medicine", che rappresenta un database degli Specialisti in Medicina di Laboratorio in tutta Europa e definisce il codice etico che i Professionisti devono mantenere nell'esercizio della loro professione. Il Registro ha identificato una coorte di quasi 3 000 Professionisti con conoscenze, abilità e competenze uniche per fornire servizi di Medicina di Laboratorio di elevata e uniforme qualità in tutti i Paesi membri.

EFLM ha, pertanto, proposto un CTF che i Paesi dell'UE potrebbero adottare e presentare alla Commissione Europea. Tale documento ha un'importanza fondamentale e rappresenta un punto di svolta per i Professionisti della Medicina di Laboratorio. Infatti, gli Stati che adotteranno il CTF garantiranno agli Specialisti della Medicina di Laboratorio una formazione completa e di alta qualità integrando l'aspetto clinico, scientifico e pratico. In particolare, lo Specialista della Medicina di Laboratorio deve acquisire sia conoscenze generali sugli esami di laboratorio che riguardino gli aspetti fisiopatologici e tecnici, sia conoscenze specialistiche che riguardino i vari settori della Medicina di Laboratorio, inclusi la chimica generale, l'ematologia, la microbiologia e la genetica. Inoltre, lo Specialista della Medicina di Laboratorio deve possedere molteplici competenze, cliniche, scientifiche, tecniche, di leadership e di

Corrispondenza a: Marcello Ciaccio, Via del Vespro 129, 90127 Palermo, Tel 09123865701, E-mail marcello.ciaccio@unipa.it

Ricevuto: 23.02.2021

Accettato: 24.02.2021

Publicato on-line: 06.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.014

comunicazione. È evidente che l' omogeneizzazione dei percorsi formativi è il requisito necessario sia per garantire a tutti i Pazienti dell'UE gli stessi standard di cura sia per permettere il mutuo riconoscimento delle qualifiche di tutti i Professionisti della Medicina di Laboratorio su tutto il territorio europeo con l'obiettivo di favorire la mobilità professionale.

Biochimica Clinica, che ha già pubblicato la traduzione del Syllabus (3,4), in questo numero propone la traduzione del documento EFLM "A proposed common training frameworks for specialists in laboratory medicine under EU directive 2013/55/EC (The recognition of professional qualifications)", recentemente pubblicato su Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (5,6) con l'obiettivo di rendere più fruibili ai Professionisti della Medicina di Laboratorio che operano sul territorio italiano, le iniziative dell'EFLM per favorire la formazione di uno Specialista di Medicina di Laboratorio che possa operare in modo trasversale ed equo su tutto il territorio europeo. Nell'elaborazione del documento, EFLM ha rilevato che in 15 Paesi Europei l'*Equivalence of Standards* è già raggiunto; in questi Paesi inoltre, la professione e la formazione specialistica sono regolamentate a livello governativo, il che è un pre-requisito fondamentale per proporre un Percorso Comune di Formazione. L'Italia rientra tra questi primi 15 Paesi ed è un sicuro motivo di orgoglio che il percorso formativo (laurea e formazione specialistica) Italiano relativo alla nostra professione abbia raggiunto tali prestigiosi livelli.

## BIBLIOGRAFIA

1. European Parliament and EU Council. Directive 2013/55/EU of the European Parliament and of the Council of 20 November 2013 amending Directive 2005/36/EC on the recognition of professional qualifications and Regulation (EU) No 1024/2012 on administrative cooperation through the Internal Market Information System ('the IMI Regulation') 2013. <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2013:354:TOC> (Ultimo accesso: gennaio 2021)
2. Jassam N, Wieringa G. La Direttiva Europea 2005/36/EC: un nuovo orizzonte per le professioni all'interno della Comunità Europea. *Biochim Clin* 2014;38:656-8.
3. Jassam N, Lake J, Dabrowska M, et al. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5 – 2018. *Clin Chem Lab* 2018;56:1846-63.
4. Cigoli MS, Lo Sasso B. Il Syllabus EFLM per la formazione post-laurea per specialisti in Medicina di Laboratorio: versione n 5 (2018). *Biochim Clin* 2018;42:247-62.
5. Wieringa G, Queraltó J, Homšak E, et al. A proposed common training framework for specialists in laboratory medicine under EU directive 2013/55/EC (The recognition of professional qualifications). *Clin Chem Lab Med* 2020 aop doi: 10.1515/cclm-2020-1504.
6. Turkman J, Zaupa P. Il Percorso Comune di Formazione per Specialisti in Medicina di Laboratorio secondo la Direttiva Europea 2013/55/EC (Il riconoscimento delle qualifiche professionali). *Biochim Clin* 2021;45:211-8.

## Il microbiota umano: il buono, il brutto e il cattivo

Iolanda Veneruso<sup>1,2</sup>, Rossella Tomaiuolo<sup>3</sup>, Federica Cariatì<sup>4</sup>, Valeria D'Argenio<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Via G. Salvatore 486, Napoli

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II

<sup>3</sup>Università Vita - Salute, San Raffaele, Milano

<sup>4</sup>Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II

<sup>5</sup>Dipartimento di Promozione delle Scienze Umane e della Qualità della Vita, Università Telematica San Raffaele, Roma

### ABSTRACT

#### Human microbiota: the good, the bad and the ugly.

In recent years, the development and the huge diffusion of Next Generation Sequencing (NGS)-based techniques has allowed the study of microbial communities at a previously unimaginable resolution level. Consequently, the knowledge of the role and functions of the human microbiota in various body sites has increased, identifying several fundamental roles for the microbiota in the development and maintenance of body homeostasis, also in relation to various ages of life. On the other hand, a number of microbiota qualitative and/or quantitative alterations have been associated with several diseases, and the trend is increasing. Since targeted interventions can modify the microbiota, the definition of its composition in physiological and pathological conditions acquires crucial importance for the development of new diagnostic tools and/or therapeutic approaches aimed at manipulating the microbiota.

In this context, the definition of standardized protocols and common guidelines to study the microbiota, and therefore the role of Laboratory Medicine, appears to be fundamental for the diffusion of metagenomic analyses in diagnostic contexts and will acquire greater relevance in the near future.

### IL MICROBIOTA UMANO: DEFINIZIONI E GENERALITÀ

Il microbiota umano può essere definito come la comunità di microorganismi (Batteri, Protozoi, Virus, Funghi e Archaea) che vivono sulla superficie e all'interno dell'ospite umano (superficie delle mucose, cute, superficie dei denti, vie respiratorie, intestino, sistema urogenitale) (1,2). Il microbioma, invece, rappresenta il patrimonio genetico di tutti questi microorganismi (vedi Glossario).

Negli ultimi 10 anni, la disponibilità di metodologie ad elevata risoluzione, basate su tecniche di Next Generation Sequencing (NGS, vedi Glossario) (3), ha reso possibile l'analisi quali/quantitativa di intere comunità microbiche; ne è conseguito un notevole impulso alla caratterizzazione del microbioma umano, anche al fine di definirne il ruolo nel mantenimento dello stato di salute dell'uomo, nonché nell'insorgenza di specifiche patologie (2,4).

Sulla base di tali studi, il concetto di "olobionte" o

superorganismo, inteso come l'insieme delle cellule umane e microbiche presenti in uno specifico ecosistema, e la cui eterogeneità dipende dalla colonizzazione delle nicchie corporee e dal corredo genetico dell'ospite, è diventato ampiamente utilizzato (2). Il microbiota, in particolare, pur essendo parte del nostro organismo biologico, è un'entità dinamica e in veloce evoluzione, in grado di rispondere rapidamente a perturbazioni esterne e di adattarsi a stimoli ambientali di varia natura (5). Pertanto, lo studio del microbiota umano rappresenta una grande opportunità non solo per chiarire i meccanismi fisiopatologici alla base di specifiche patologie, ma anche per identificare nuovi biomarcatori e/o possibili obiettivi di terapie mirate.

Si stima che il microbiota sia composto da circa 10-100 trilioni di cellule microbiche (circa 10 volte in più rispetto al numero di cellule umane) e che contenga >1000 specie batteriche e 100 volte più geni rispetto al totale dei geni contenuti nel genoma umano (1). Ogni ceppo batterico, infatti, possiede un genoma che contiene numerosi geni, offrendo sostanzialmente una

Corrispondenza a: Valeria D'Argenio, E-mail [dargenio@ceinge.unina.it](mailto:dargenio@ceinge.unina.it); Tel 081 3737909.

Ricevuto: 14.10.2020

Revisionato: 16.10.2020

Accettato: 21.11.2020

Pubblicato on-line: 23.02.2021

DOI: 10.19186/BC\_2020.103

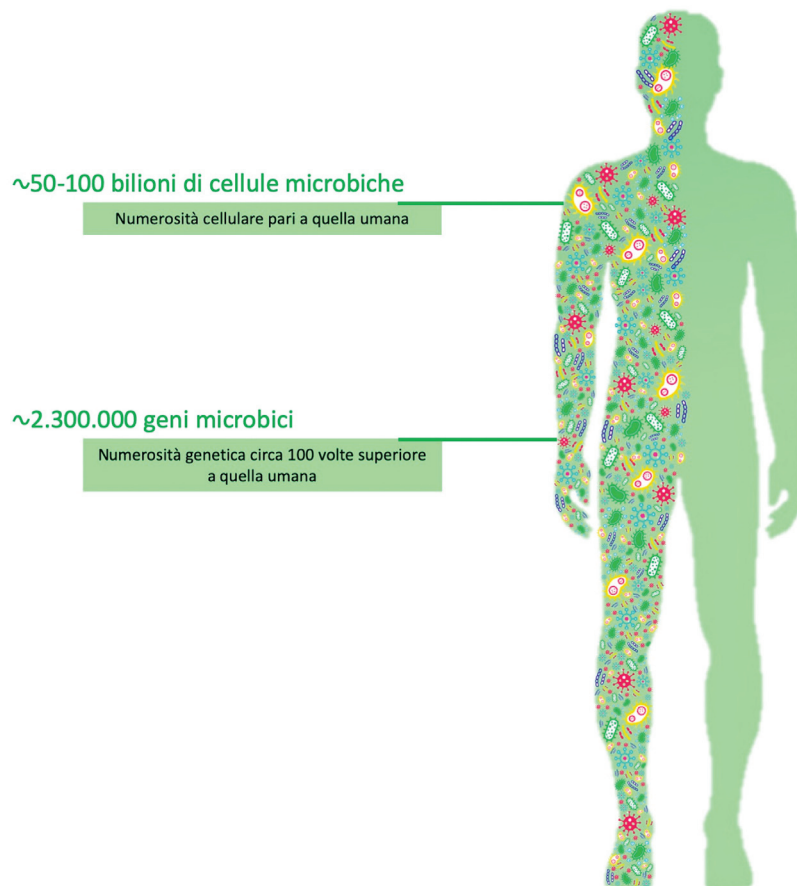
maggior diversità genetica, e quindi flessibilità, rispetto al genoma umano (6). Recentemente, queste stime sono state ridimensionate ed è stato dimostrato che il numero di cellule batteriche e quello di cellule umane, presenti in ciascun individuo adulto, è in rapporto 1:1, suggerendo, comunque, che siamo composti per metà da batteri (Figura 1) (2).

Il Dominio dei Batteri include 29 *Phyla*, 6 dei quali sono predominanti nel microbiota umano, ossia Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria, e Fusobacteria. L'abbondanza relativa dei membri di questi *phyla* crea vere e proprie nicchie corporee (1): durante la fase di colonizzazione, infatti, il microbiota umano segue una traiettoria sito-specifica, sviluppando in ogni distretto corporeo una specifica biogeografia (2,4).

Il rapporto tra l'ospite e il microbiota si instaura già nel periodo ante-natale; numerose evidenze suggeriscono, infatti, che la colonizzazione batterica inizi all'interno dell'utero e che la tipologia di parto possa influenzare la composizione microbica (2,4). Si ritiene, in particolare, che i primi anni di vita (dal concepimento fino a 2-3 anni di età) siano cruciali per

l'instaurarsi di una corretta colonizzazione microbica. Infatti, benché il ruolo del microbioma in epoca prenatale sia ancora controverso, diversi studi suggeriscono che esso possa influenzare la suscettibilità allo sviluppo di specifiche patologie, anche in età adulta (4). Successivamente, al momento del parto e immediatamente dopo la nascita, i neonati sono esposti ai microbi materni e ambientali; il travaglio e il parto, infatti, rappresentano la prima sostanziale esposizione ad un complesso microbico e rappresentano il meccanismo primordiale del trasferimento intergenerazionale del microbiota nei mammiferi (5). Durante i primi anni di vita, è stato stimato che circa 10<sup>13</sup>-10<sup>14</sup> microbi/mL, appartenenti a circa 500-1000 specie, colonizzino il solo tratto gastrointestinale dove si localizza la maggior parte del microbiota umano, anche se molteplici batteri sono stati ormai identificati in pressoché tutto l'organismo, incluse nicchie precedentemente considerate sterili.

In condizioni fisiologiche, il neonato e il microbiota si sviluppano in sintonia sotto l'effetto di stimoli nutrizionali, immunologici, ormonali e prebiotici del latte materno (5). Dopo lo svezzamento, il microbiota



**Figura 1**

**I numeri del microbiota umano.** Si stima che il rapporto tra cellule microbiche e cellule eucariotiche sia di 1:1, suggerendo che un individuo adulto sia costituito per metà da microbi. Tutti questi microrganismi, inoltre, esprimono milioni di geni coinvolti in numerose funzioni essenziali per il mantenimento dell'omeostasi corporea.

intestinale si stabilizza fino a diventare simile a quello di un individuo adulto e caratterizzato da un *core* microbico che tende a rimanere costante per tutta la durata della vita. Infatti, la caratterizzazione longitudinale (vedi Glossario) del microbioma intestinale umano ha dimostrato che il microbioma di un adulto resta relativamente stabile e unico per ogni individuo, comparato con il drastico cambiamento che avviene durante i primi tre anni di vita (2,4).

Quindi, nonostante il microbioma umano presenti una certa variabilità intra-individuale nel corso del tempo, a causa di una serie di stimoli endogeni ed esogeni, l'estensione della variazione longitudinale è significativamente più bassa rispetto alla variazione osservata tra individui diversi, indicando che il microbioma umano è individuale (1). Questo dato è stato confermato anche da studi effettuati su gemelli omozigoti che sono a malapena simili tra di loro per composizione e struttura del microbioma, suggerendo che l'effetto del genoma umano sull'insediamento della comunità microbica sia limitato e che l'elemento determinante sia rappresentato da fattori ambientali (6).

L'interesse nello studio del microbiota umano risiede nel fatto che questi microorganismi partecipano a numerosi aspetti della fisiologia umana, inclusi lo sviluppo e il rafforzamento del sistema immunitario, il metabolismo energetico, le funzioni endocrine e intestinali. Inoltre, i microrganismi della flora autoctona inibiscono e prevengono l'invasione ad opera di agenti patogeni esogeni e provvedono anche a funzioni essenziali, quali la biosintesi di vitamine del gruppo B e di vitamina K, nonché la degradazione di carboidrati complessi derivanti da fibre vegetali non digeribili (1,6).

Uno squilibrio nella composizione qualitativa e/o quantitativa del microbiota, o disbiosi, indotto da vari fattori, come lo stile di vita, la dieta e l'utilizzo di farmaci antimicrobici, a causa dell'interazione con il sistema immunitario, endocrino e nervoso (2,6), è associato all'insorgenza e/o all'evoluzione di un numero elevato di patologie, quali l'obesità, patologie cardiovascolari, malattie autoimmuni, cancro, infezioni, sindrome da fatica cronica, colite, vaginosi batterica, malattie neurodegenerative, ansia e depressione (1,2,6,7). In particolare, alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato che una complessiva riduzione della densità microbica del tratto digestivo sia associata a malattie, quali eczema, asma, malattie infiammatorie, diabete, obesità, allergie, e disordini del tratto digestivo (7).

Nonostante la struttura, la funzione, il dinamismo e l'interazione di questi microorganismi giochino un ruolo essenziale nel metabolismo umano, la loro identificazione, quantificazione e caratterizzazione risulta problematica (7). In particolare, benché numerosi studi abbiano descritto una disbiosi microbica in presenza di diverse patologie, il significato funzionale di tale alterazione non è ancora ben chiaro.

Lo scopo di questa rassegna è descrivere le metodologie attualmente disponibili per lo studio del microbiota umano, con particolare riferimento alle possibili fonti di bias che possono inficiare l'intera

procedura analitica, dalla selezione e raccolta dei campioni fino all'analisi dei dati. Verranno, poi, descritte le principali nicchie microbiche presenti nel nostro organismo con riferimento al ruolo del microbiota per il mantenimento dell'omeostasi corporea e la descrizione di specifiche alterazioni associate a determinate patologie.

## METODOLOGIA

La ricerca delle fonti bibliografiche è stata effettuata utilizzando PubMed e restringendo la ricerca agli articoli indicizzati pubblicati tra il 2010 e il 2020. Sono state utilizzate le seguenti parole chiave: "human microbiota", "metagenomics", "16S analysis", "metatranscriptomics", "human gut microbiota", "human respiratory microbiota" e "human genito-urinary microbiota", "microbiota and human diseases".

## METODI PER LO STUDIO DEL MICROBIOTA UMANO

La metagenomica è quella branca delle scienze "omiche" che studia intere comunità microbiche nel loro ambiente, senza la necessità di ricorrere a tecniche colturali (8). Negli ultimi anni, la metagenomica è stata ampiamente utilizzata per caratterizzare specie e contenuto genico del microbioma umano (2,5-7). Sebbene numerosi studi, basati sulla caratterizzazione del microbioma in specifici siti corporei e/o in associazione a specifiche patologie, abbiano fornito risultati promettenti per applicazioni di tipo clinico, sarebbe necessaria la validazione di un protocollo unico e condiviso perché questi dati abbiano una reale applicabilità. Attualmente, infatti, uno dei principali limiti degli studi di metagenomica è rappresentato dalla presenza di un elevato numero di variabili che rende estremamente difficile, se non impossibile, il confronto dei risultati ottenuti analizzando popolazioni differenti, spesso utilizzando diversi campioni biologici e differenti protocolli analitici. La standardizzazione di tali variabili, al fine di minimizzare le possibili fonti di errore, è fondamentale per la corretta interpretazione dei risultati ottenuti, nonché per valutare la loro possibile trasferibilità in contesti diagnostici e/o terapeutici.

### Fase pre-analitica

Come in altri campi della biochimica clinica e della Medicina di Laboratorio in senso lato, la fase pre-analitica, intesa come la scelta della popolazione da analizzare, la definizione dei criteri di inclusione e di esclusione, la scelta del campione biologico da analizzare, nonché le modalità di raccolta, conservazione e invio dei campioni stessi, è fondamentale per assicurare l'accuratezza, la riproducibilità e l'appropriatezza delle indagini effettuate (Figura 2).

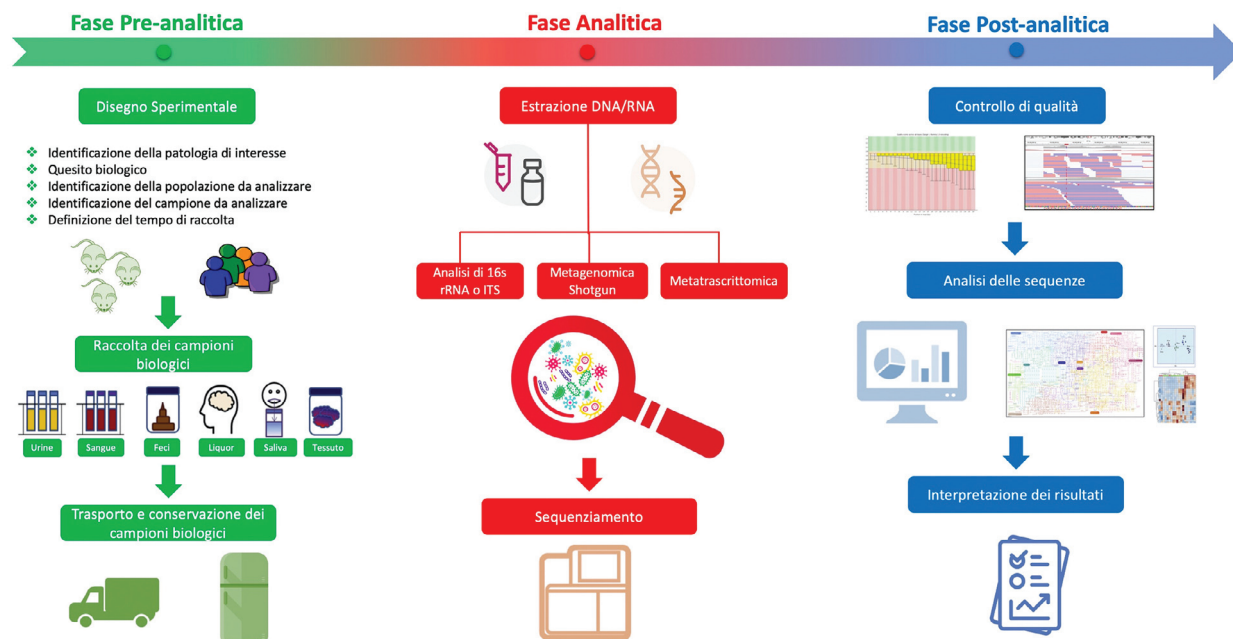


Figura 2

**Analisi del microbiota.** Descrizione completa del flusso di lavoro dalla fase pre-analitica a quella post-analitica.

### Scelta della popolazione

Studi del microbioma basati sull'analisi di diverse popolazioni forniscono informazioni sulle associazioni tra un tipo di microbioma e uno specifico fenotipo (2, 5-7, 9-11).

Gli studi del microbioma, infatti, si propongono di stimare la composizione tassonomica e funzionale dei diversi microrganismi in gruppi di campioni attraverso esperimenti trasversali e longitudinali. Lo studio della popolazione può essere svolto identificando gruppi differenti di soggetti che corrispondono a particolari condizioni fisiologiche, etniche, caratteristiche ecologiche e distribuzione geografica. Uno degli obiettivi in questi studi è capire la diversità del microbioma nei vari gruppi di campioni analizzati e identificare biomarcatori in grado di differenziarli. Cambiamenti della composizione microbica all'interno di ognuno di questi gruppi giocano un ruolo importante nella comprensione della struttura delle comunità (9).

Dal momento che la composizione del microbiota può essere influenzata da numerosi fattori fisiologici e ambientali, perché le differenze osservate siano effettivamente legate alla presenza/assenza di un determinato fenotipo, è necessario minimizzare le altre fonti di variabilità. È di particolare importanza, pertanto, stabilire a priori i criteri di inclusione, in modo da confrontare gruppi quanto più possibile omogenei, e soprattutto i criteri di esclusione (assunzione di farmaci e/o integratori ed eventuali patologie concomitanti) in modo da evitare fattori confondenti. È, inoltre, molto utile preparare una scheda anamnestica dettagliata al fine di raccogliere quante più informazioni possibile (tipo di

parto, tipo di allattamento, dieta, fumo, assunzione di alcool, e quant'altro) che possano essere utilizzate in fase di analisi per stratificare i soggetti e identificare differenze effettive tra i gruppi analizzati.

### Selezione, raccolta e conservazione dei campioni biologici

Le procedure di raccolta e conservazione dei campioni biologici rappresentano una fase cruciale per garantire l'integrità e la stabilità del materiale raccolto (12).

Feci, urine, plasma/siero, saliva, microparticelle di esalazione, fluido cerebrospinale e tessuti da organi bersaglio sono potenziali campioni biologici per lo studio del microbioma. Il tipo di selezione dei campioni dipende da vari fattori, come la disponibilità del campione, i modelli di studi precedenti, il tipo di malattia e il quesito biologico cui si intende rispondere (13). I campioni per l'analisi del microbioma possono essere raccolti utilizzando kit commercialmente disponibili consistenti in un tampone, un tubo e, spesso, una soluzione tampone. La raccolta può essere effettuata da personale sanitario o dall'individuo stesso tramite auto-raccolta. In entrambi i casi, è importante che il campionamento sia quanto più possibile standardizzato, il che implica la necessità di comprendere e rispettare rigorosamente il protocollo di raccolta in modo da impedire la contaminazione (ad esempio da pelle, mani, polvere, indumenti) e preservare la composizione del campione originale (14).

Una volta raccolta, la maggior parte dei campioni viene conservata prima di essere utilizzata per l'analisi; la condizione di stoccaggio ottimale comporta,

generalmente, l'immediato posizionamento in ghiaccio e il successivo congelamento a - 80 °C.

La stabilità del campione merita particolare considerazione in caso di sequenziamento del DNA ma soprattutto dell'RNA, che è vulnerabile alla degradazione da parte degli enzimi RNAsi dell'ospite e dell'ambiente. Pertanto, al momento della raccolta del campione può essere preso in considerazione l'uso di stabilizzanti chimici degli acidi nucleici. Una volta congelati, il DNA e l'RNA rimangono relativamente intatti; tuttavia, fasi multiple di congelamento-scongelo durante la fase di aliquotazione del campione e la sua lavorazione possono provocare una degradazione dell'acido nucleico dovuta in parte al rilascio di nucleasi endogene (15). Infine, va considerata la possibilità di introdurre contaminazioni da parte degli stessi tamponi di stoccaggio; anche il tempo di posizionamento del campione in ghiaccio, nonché il tempo di conservazione, hanno un impatto sulle analisi finali (14).

### Fase analitica

Una volta selezionate le popolazioni di interesse e collezionati i campioni biologici in maniera adeguata, l'analisi del microbioma si basa sull'utilizzo di specifici protocolli di NGS (12), che permettono lo studio della complessità di popolazioni microbiche attraverso tre approcci principali:

- analisi dell'RNA ribosomiale 16S (16S rRNA, vedi Glossario) o delle Regioni Trascritte Interne (ITS, vedi Glossario);
- analisi dell'intero metagenoma di un campione (approccio "shotgun", vedi Glossario);
- analisi dell'espressione genica del microbiota e dell'ospite (metatrascrittomica) (Figura 2).

Sebbene il sequenziamento "shotgun" fornisca informazioni più complete sull'intero pool genico di microbi e ospite, l'elevata quantità di dati generata richiede specifiche capacità bioinformatiche nell'assemblaggio delle sequenze, nella mappatura e nell'analisi. Pertanto, in molti studi, sia clinici che ambientali, il sequenziamento di un amplicone del gene del 16S rRNA, che copre le regioni variabili del gene stesso, è il metodo più utilizzato per l'analisi della composizione delle comunità batteriche, fornendo un buon rapporto costo-efficacia e una risoluzione sufficiente. Il sequenziamento permette di identificare i batteri che non possono essere coltivati e associa le caratteristiche microbiche con un particolare stato fisiologico o malattia, dal momento che può essere misurata l'abbondanza relativa di ogni *taxon* (vedi Glossario). Tuttavia, i metodi di sequenziamento non possono discriminare tra batteri vivi e DNA transitorio e, nonostante i recenti progressi, non possono rilevare facilmente le popolazioni poco rappresentate (10).

Recentemente, anche approcci di metabolomica (vedi Glossario) sono stati utilizzati per ottenere dati funzionali relativi alla presenza di uno specifico microbiota.

### Analisi del 16S rRNA

Uno degli approcci più utilizzati per studiare il microbioma è basato sull'amplificazione e il sequenziamento di specifiche regioni di interesse, come il gene del 16S rRNA per Archaea e Batteri e le ITS (Spaziatore interno trascritto, vedi Glossario) per i Funghi (1,14,16).

Per ottenere la completa valutazione del microbioma, il punto di partenza essenziale è una buona preparazione del DNA. Esistono diversi protocolli per l'isolamento del DNA, che includono opzioni commerciali oppure i metodi tradizionali di estrazione in fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo. Il passaggio fondamentale è la fase di lisi della parete cellulare che, essendo differente nei vari tipi di microorganismi, deve essere efficace in modo da assicurare che ogni specie sia rappresentata nel campione finale (17). Al momento, tuttavia, non esistono metodi gold standard, ma i singoli gruppi di ricerca ottimizzano strategie di lisi in dipendenza della matrice di partenza che viene utilizzata.

Il gene che codifica per il 16S rRNA, lungo circa 1500 bp, presenta nove regioni iper-variabili (V1-V9) separate da regioni altamente conservate (14), caratteristiche che lo rendono un marcatore ideale per catalogare i microorganismi (1). Le regioni iper-variabili, ciascuna diversa per lunghezza, variabilità genetica e resa filogenetica, contengono la variazione genetica usata per classificare ogni sequenza in una Unità Tassonomica Operativa (OTU). L'elevata presenza di differenze genetiche nella regione variabile assicura una migliore separazione tassonomica delle sequenze, facilitando l'interpretazione dei dati (17). In particolare, le regioni da V4 a V7 hanno la più alta risoluzione filogenetica, mentre le regioni V2 e V9 hanno una risoluzione più povera. Filogeneticamente, la regione V1-V3 determina molte famiglie di batteri, ma permette meno distinzioni tra gli Archaea. Al contrario, la regione V3-V5 fornisce un'elevata specificità in entrambi i regni procarioti, ma non è in grado di risolvere i generi all'interno delle famiglie batteriche Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, che comprendono importanti patogeni dell'uomo, come *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (17).

Basandosi sulle regioni conservate è possibile disegnare e utilizzare primers universali per individuare e amplificare il DNA batterico di ogni campione (1). I diversi primers per il gene 16S rRNA, le cui sequenze spesso contengono basi degenerate (per la regione V4, l'11% di basi degenerate per il primer Forward e 15% di basi degenerate per il primer Reverse), sono di assoluta importanza per l'accuratezza dell'analisi, dal momento che le specifiche regioni target influenzano i tipi di batteri che potranno essere identificati dall'analisi (14,17). La selezione delle sequenze dei primers è generalmente basata su gruppi tassonomici e risoluzione desiderata per il tipo di campione, e su compatibilità della dimensione dell'amplicone con la piattaforma di sequenziamento scelta. Le sequenze di primer

ampiamente utilizzate, adattate per il sequenziamento NGS con piattaforma Illumina, sono state progettate dal consorzio "Earth Microbiome Project" (EMP) e amplificano specificamente la regione V4. I protocolli standard per il sequenziamento di ampliconi 16S con questo metodo sono disponibili online sul sito web EMP (<https://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/>) e comprendono le sequenze dei primers e le condizioni della Polymerase Chain Reaction (PCR) (17).

Il sequenziamento delle regioni iper-variabili del gene 16S rRNA rappresenta il gold-standard per l'assegnazione tassonomica (10). L'attuale sequenziamento del gene del 16S rRNA e delle ITS si basa sulla lunghezza di sequenziamento consentita dal sequenziatore Miseq (Illumina), spesso sfruttando la lunghezza di sequenziamento 2x300 in modo da coprire un maggior numero di regioni variabili e ottenere la massima precisione possibile (17). Di conseguenza, vi è un notevole interesse verso la possibilità di ottenere la sequenza completa del gene del 16S rRNA e delle ITS utilizzando le piattaforme di sequenziamento di terza generazione, PacBio o Oxford Nanopore, ma la limitata disponibilità di database di riferimento e il tasso di errore ancora elevato di tali tecnologie limitano la diffusione di questi metodi (16).

Attualmente, dunque, l'analisi del 16S rRNA è il metodo più comunemente impiegato per analizzare comunità microbiche e presenta numerosi vantaggi:

- basso costo ed elevata produttività;
- disponibilità di pipeline di analisi validate;
- disponibilità di banche dati di riferimento (18,19).

Tale metodo presenta, tuttavia, alcuni limiti dell'approccio. In primo luogo, il gene del 16S rRNA presenta variazioni nel numero di copie per cellula, caratteristica che può alterare l'analisi, in particolar modo quando bisogna stimare l'abbondanza microbica. In secondo luogo, la fase di amplificazione è suscettibile a distorsioni introdotte dall'efficienza dei primers e dall'amplificazione selettiva di alcuni batteri piuttosto che di altri, che può anche portare ad una rappresentazione sbagliata delle relative abbondanze dei membri della comunità. Inoltre, il gene 16S non fornisce informazioni riguardanti l'intero genoma ed è utile per l'identificazione dei soli Batteri e Archaea (1) (Tabella 1).

In maniera analoga al 16S rRNA per i batteri, è possibile sequenziare le ITS per ottenere informazioni relativamente alla composizione micotica di un campione di interesse. Vantaggi e svantaggi di questo approccio sono sovrapponibili a quelli discussi per l'analisi del 16S; in questo caso, inoltre, la disponibilità di un numero limitato di sequenze genomiche depositate in banche dati rende più difficile l'analisi per l'identificazione univoca delle diverse tipologie di funghi (20) (Tabella 1).

### *Metagenomica Shotgun*

Un altro approccio utilizzato per lo studio delle comunità microbiche è il sequenziamento di tipo shotgun o WGS (Whole Genome Shotgun Sequencing) (19). In

questo caso, si effettua il sequenziamento dell'intero pool di DNA estratto direttamente da un campione di interesse che, pertanto, conterrà il genoma dell'ospite e tutti i genomi microbici presenti nel campione stesso (1, 16,19). L'approccio molecolare è simile a quello utilizzato per l'analisi di un singolo genoma ma, in questo caso, si ottengono sequenze relative all'ospite e a tutti i microrganismi, inclusi Batteri, Archaea, Funghi, Virus e Protozoi, presenti nell'ambiente studiato (2,19). Di conseguenza, l'assegnazione tassonomica richiede strumenti di assemblaggio altamente performanti e database costantemente aggiornati (2,16).

Relativamente all'identificazione tassonomica, il sequenziamento WGS non è soggetto ai bias introdotti dalla fase di PCR e non è influenzato dal numero variabile di copie del gene 16S nei vari batteri; inoltre, rispetto al sequenziamento target del 16S rRNA, permette una maggiore risoluzione biologica (fino a livello di specie e ceppi) e fornisce dati significativi sul potenziale funzionale della comunità microbica, come i geni coinvolti nella resistenza agli antimicrobici o codificanti per specifiche molecole biochimiche (1,19). Tuttavia, i maggiori limiti di questo approccio restano il costo elevato e le significative sfide computazionali e analitiche (1). È verosimile, pertanto, che la progressiva riduzione dei costi del sequenziamento, determini il corrispondente aumento della diffusione di studi di metagenomica con approccio shotgun (2) (Tabella 1).

### *Metatrascrittomica*

È l'analisi di tutto il trascrittoma di un determinato campione; pertanto, permette di valutare l'espressione genica del microbiota presente in un organo o tessuto specifico e in una circostanza specifica, nonché l'espressione genica dell'ospite (2). I metodi di metatrascrittomica, in maniera analoga alla metagenomica shotgun, permettono di ottenere informazioni complesse relative all'insieme di tutti i genomi presenti in un campione (16,21). I dati delle analisi di metatrascrittomica, quindi, completano i dati di metagenomica spiegando esattamente quali dei geni che sono stati annotati nell'analisi del genoma sono espressi, e permettendo, così, di dimostrare le funzioni di un potenziale repertorio di microorganismi. In questo tipo di analisi è possibile identificare le vie metaboliche che possono essere associate a particolari condizioni. Pertanto, la metatrascrittomica offre una prospettiva più informativa rispetto alla metagenomica, in quanto può rivelare dettagli sulle popolazioni che sono trascrizionalmente attive e non solo identificare il contenuto genetico delle popolazioni microbiche presenti in un campione di interesse (21).

Solitamente, le analisi di metatrascrittomica prevedono l'isolamento dell'RNA totale dai campioni di interesse (ad esempio, intestino, pelle, cavità orale). Successivamente, è necessario arricchire le frazioni di RNA da sequenziare. Dal momento che, a differenza dell'mRNA eucariotico, l'mRNA procariotico non possiede la coda di poli-A, rendendo inapplicabile la sua

**Tabella 1**

Confronto delle tecniche di sequenziamento utilizzate per l'analisi del microbiota.

Metodologia analitica	Tipo di approccio	Microrganismi identificabili	Vantaggi	Svantaggi
Sequenziamento del 16Sr RNA <sup>1</sup>	Targettato	Batteri e Archaea	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapidità di analisi</li> <li>- Costi relativamente contenuti</li> <li>- Disponibilità di banche dati per l'identificazione tassonomica</li> <li>- Possibilità di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni</li> <li>- Possibilità di identificare anche microrganismi non coltivabili in laboratorio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Scarsa risoluzione a livello di specie</li> <li>- Impossibilità di discriminare tra microrganismi vitali e non vitali</li> <li>- Impossibilità di stabilire nessi funzionali</li> </ul>
Sequenziamento delle Regioni Trascritte Interne <sup>1</sup>	Targettato	Miceti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapidità di analisi</li> <li>- Costi relativamente contenuti</li> <li>- Possibilità di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni</li> <li>- Possibilità di identificare anche microrganismi non coltivabili in laboratorio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indisponibilità di banche dati aggiornate ed esaustive per l'identificazione tassonomica</li> <li>- Impossibilità di discriminare tra microrganismi vitali e non vitali</li> <li>- Impossibilità di stabilire nessi funzionali</li> </ul>
Metagenomica shotgun <sup>1</sup>	Non targettato	Batteri, Archaea, Miceti, Virus, Protozoi e Ospite	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analisi di tutti i microrganismi presenti in un campione di interesse senza bias di selezione</li> <li>- Elevata risoluzione tassonomica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Impossibilità di discriminare tra microrganismi vitali e non vitali</li> <li>- Costi elevati</li> <li>- Difficoltà legate all'analisi computazionale</li> <li>- Impossibilità di stabilire nessi funzionali</li> </ul>
Metatrascrittomica	Non targettato	Batteri, Archaea, Miceti, Virus, Protozoi e Ospite	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analisi dell'espressione genica di tutti i microrganismi presenti in un campione di interesse, incluso l'ospite</li> <li>- Possibilità di stabilire nessi funzionali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Costi elevati</li> <li>- Difficoltà legate all'analisi computazionale</li> </ul>

<sup>1</sup>Vedi Glossario.

selezione durante la sintesi del cDNA, sono stati sviluppati e implementati vari approcci alternativi (21). Tra questi, la rimozione degli rRNA mediante specifiche biglie magnetiche, rappresenta un'opzione attraente. L'RNA residuo, rappresentativo di geni trascrizionalmente attivi, viene utilizzato per preparare una libreria che viene amplificata e, poi, sequenziata (21).

Oltre agli aspetti tecnici relativi all'estrazione, alla qualità e alla purificazione dei campioni di RNA, va sottolineato che non sono ancora disponibili strumenti bioinformatici completi per l'analisi dei dati di metatrascrittomica (2) (Tabella 1).

### Metabolomica

Questo approccio analitico è utilizzato per determinare i profili dei metaboliti (metaboloma) prodotti da un dato ceppo o da un singolo campione. Le piattaforme più comunemente usate per caratterizzare il

metaboloma includono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e la spettrometria di massa (MS) collegate ad un sistema di separazione di cromatografia liquida (11).

Per gli studi di metabolomica sono necessarie una attenta raccolta dei campioni e appropriate condizioni di conservazione. Ad esempio, i liquidi biologici devono essere separati in aliquote per diminuire il numero di cicli di scongelamento. Quando si raccolgono campioni come plasma/siero, liquido cerebro-spinale e tessuti, devono essere considerati i cambiamenti metabolici indotti da stress, come quelli promossi da catecolamine o da ormoni. L'utilizzo di soluzioni che contengano detergenti o polimeri dovrebbero essere evitati per prevenire interferenze con la spettrometria di massa. Il processo di pretrattamento dei campioni dipende dai metaboliti target, dal tipo di campione e dagli strumenti utilizzati per l'analisi; tra le tecniche più comunemente utilizzate, rientrano l'estrazione con solventi acquosi e solventi con percentuale organica (13).

La metabolomica fornisce informazioni sulla composizione dei metaboliti secreti e modulati dalla comunità microbica, quindi consente una comprensione delle dinamiche funzionali che influenzano le interazioni tra la comunità e l'ospite. Questo approccio, pertanto, può integrare i dati di metagenomica e metatranscrittomica (21).

### Fase post-analitica

Indipendentemente dal metodo utilizzato per lo studio del microbioma, i risultati comprenderanno matrici di dati dei campioni rispetto alle caratteristiche microbiche (per esempio specie, taxa, geni e vie metaboliche) (22). Per analizzare il gran numero di dati prodotti dalle analisi di NGS sono disponibili diversi protocolli bioinformatici (serie prescritte di fasi di elaborazione che convertono i dati grezzi in materiale interpretabile) (Figura 2). L'obiettivo di tali protocolli è assegnare ciascuna sequenza di DNA ad un livello tassonomico (dal *phylum* alla specie) per determinare la composizione e l'abbondanza microbica di un campione (14). Nella maggior parte degli studi di metagenomica, l'analisi delle sequenze si prefigge di individuare la diversità microbica differenziale e l'abbondanza dei *taxa* o di componenti funzionali (ad esempio, geni e vie metaboliche) tra i gruppi di confronto (come ad esempio gruppo trattato *versus* gruppo di controllo) (16).

Nonostante i numerosi progressi in questo campo, sono sorti alcuni limiti dell'analisi bioinformatica, legati soprattutto alle differenze nei protocolli molecolari utilizzati dai laboratori. Inoltre, i metodi di NGS sono particolarmente sensibili alla distorsione della profondità del sequenziamento, a causa della difficoltà di individuare microrganismi poco rappresentati. Infine, le diverse metodologie per le analisi bioinformatiche (ad esempio, raggruppamento di OTUs, assegnazione tassonomica o analisi statistica) possono influenzare sostanzialmente i risultati (10).

Il primo passo dell'analisi bioinformatica consiste nella valutazione della qualità dei dati di sequenza utilizzando software come FastQC (23). Successivamente, in base al tipo di approccio molecolare utilizzato, si utilizzeranno specifiche strategie di analisi.

Nel caso del sequenziamento del 16S rRNA, sequenziando le regioni variabili (V1-V9), è possibile raggruppare le sequenze ottenute basandosi su soglie di similarità di sequenza predefinite (1) per classificare i microrganismi in OTU che sono utilizzate per effettuare le analisi filogenetiche (14). La soglia di identità di sequenza è il 94,5% per i generi e l'86,5% per le famiglie (14). Tipicamente, per valori di similarità di sequenza >97%, le sequenze sono clusterizzate in OTU. Recentemente, tale soglia è stata rivalutata a causa della disponibilità di un gran numero di sequenze. È stato suggerito che le soglie di identità ottimali siano aumentate a circa il 99% o più (14). La scelta di questa soglia, tuttavia, è spesso arbitraria in quanto tali tagli non corrispondono a tagli biologicamente rilevanti e possono

cambiare in base alla scelta delle regioni variabili sequenziate (16). Indipendentemente dalla soglia utilizzata, le OTU consistono di gruppi di sequenze di DNA utilizzate per classificare gruppi di microrganismi strettamente correlati (1,10). Durante l'assegnazione, tutte le sequenze vengono filtrate in base alla qualità e raggruppate (16). La matrice finale di abbondanza consiste in un valore che corrisponde alla conta di ogni OTU tra i differenti campioni (in dati a selezione incrociata) o in punti nel tempo (dati longitudinali). Le informazioni sui microbi costituenti ogni campione possono essere meglio osservate correlando i dati di abbondanza relativa con informazioni filogenetiche: GraPhlAn e Krona sono due metodi alternativi per ottenere tale rappresentazione (9). Sebbene uno dei principali vantaggi del raggruppamento in OTU sia il tempo di analisi, la loro interpretazione biologica rimane una sfida (10). Poiché le differenze genetiche delle specie raggruppate nelle stesse OTU vengono trascurate, il raggruppamento porta ad una perdita della diversità effettiva. È importante, inoltre, sottolineare che il metodo utilizzato per il raggruppamento delle OTU influenza direttamente i risultati finali (14). I pacchetti software di bioinformatica open source, come Mothur (14) e QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), che integra un approccio combinatorio per il raggruppamento di OTU (2), combinano tutte le fasi di elaborazione delle sequenze, senza applicare una procedura standardizzata e modifiche dei parametri analitici che possono portare ad un eccesso di sovra- o sotto- interpretazione della composizione microbica (14). Le sequenze sono allineate ai database di riferimento per l'assegnazione tassonomica. Di conseguenza, la limitazione di questi approcci è che possono essere identificate solo le specie batteriche annotate nelle banche dati. Pertanto, i batteri sconosciuti, corrispondenti alle sequenze non allineate, non sono identificati. Successivamente, le sequenze non assegnate sono raggruppate in base alla loro similarità di sequenza. In questo modo, l'assegnazione tassonomica è più efficiente e dovrebbe evitare la mancanza di informazioni causata dai limiti di database di genomi batterici (2). Recentemente, è possibile utilizzare strategie alternative, non basate sulle OTU, quali DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2), UNOISE2 e Deblur, che utilizzano metodi statistici per correggere gli errori di sequenza negli ampliconi e permettere una più accurata identificazione tassonomica (2). Dopo l'assegnazione tassonomica, le comunità batteriche vengono confrontate per evidenziare differenze significative fra i gruppi (ad esempio pazienti *versus* sani). Uno degli approcci più utilizzati a questo scopo è il metodo UniFrac che permette il confronto tra gruppi misurando la distanza filogenetica tra insiemi di *taxa* attraverso l'esecuzione di diversi test (2). Infine, il sequenziamento del 16S rRNA permette di predire il profilo funzionale assumendo che sia la somma dei profili funzionali di tutte le specie identificate (24, 25).

Nel caso di analisi di metagenomica shotgun, l'assemblaggio delle sequenze può essere effettuato *de*

*novo*, basandosi su genomi di riferimento, o un ibrido di entrambi i metodi. Tra i software comunemente utilizzati per l'assemblaggio *de novo* figurano Metavelvet, IDBA-UD, metaSPAdes e MEGAHIT. Gli assemblatori basati sull'allineamento delle sequenze rispetto ad un genoma di riferimento, come MetaCompass, sono limitati dalla disponibilità di genomi di riferimento e dalla qualità dei database (16). Al fine di superare i limiti di entrambi gli approcci, sono stati sviluppati assemblatori specifici per la metagenomica shotgun, quali Soapdenovo, Velvet, Metavelvet, Meta-ibda, Genovo, Bambus2 e Ray-Meta. Attualmente, non esiste un consenso unico sulla migliore strategia di assemblaggio (2). Infatti, mentre quando si assembla un singolo genoma è possibile utilizzare la copertura di sequenziamento per identificare le regioni ripetute e gli errori di sequenziamento, nel caso di un metagenoma la copertura di sequenziamento è una conseguenza dell'abbondanza di ogni genoma all'interno della comunità analizzata. L'assemblatore dovrebbe, quindi, essere in grado di ottenere una buona copertura dei genomi altamente rappresentati, senza perdere quelli poco rappresentati. Va, inoltre, notato che, poiché il DNA umano e batterico dovrebbero essere i più rappresentati nei dati metagenomici, l'assemblaggio di microbi scarsamente rappresentati può risultare molto difficile e può generare una perdita di informazioni. Di conseguenza, è necessaria un'elevata profondità di sequenziamento per essere sicuri di ottenere sequenze informative che rappresentino l'intera comunità (2). Un'altra difficoltà della fase di assemblaggio è rappresentata dalla possibilità di avere nello stesso metagenoma due ceppi della stessa specie batterica, i cui genomi possono differire per pochi nucleotidi; PanPhlAn è un tool open source in grado di garantire una risoluzione a livello di ceppo, compresa l'identificazione di nuovi ceppi, dai dati di metagenomica (2). Gli approcci shotgun, infine, consentono anche un'analisi di tipo funzionale, basata sull'identificazione dei geni per dedurre le loro probabili funzioni. A tal fine, sono stati sviluppati e ottimizzati diversi metodi, quali Fraggenescan, Metagenemark e Glimmer-MG. Una volta identificati i geni, possono essere utilizzate anche dati specifiche per le predizioni funzionali, ad esempio IMG, Metaref, dbCAN e Humann (2).

A differenza dei due precedenti approcci, per gli studi di metatrascrittomica non sono ancora disponibili protocolli di analisi completi. Programmi bioinformatici, come SOAPdenovo, sono stati utilizzati per l'allineamento e l'assemblaggio di dati metatrascrittomici da campioni microbici (16).

## COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA UMANO IN CONDIZIONI FISILOGICHE E IN ASSOCIAZIONE A SPECIFICHE PATOLOGIE

### Apparato digerente

È ormai noto che il microbiota intestinale svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dello stato di salute (2,

26, 27). Il microbiota intestinale, infatti, stabilisce una relazione simbiotica con la mucosa intestinale e conferisce all'individuo sano funzioni sostanziali metaboliche, immunologiche e protettive (28). In particolare, il microbiota intestinale:

- potenzia l'abilità di estrarre energia dagli alimenti;
- modifica lo stimolo dell'appetito;
- partecipa alla sintesi di vitamine (folati, vitamina K, biotina, riboflavina, cobalamina e altre vitamine del gruppo B) e amminoacidi;
- influenza la biotrasformazione degli acidi biliari;
- aumenta la biodisponibilità dei minerali;
- favorisce il metabolismo di alcune molecole (inclusi gli xenobiotici) (2,26,27).

Il microbiota intestinale, inoltre, è coinvolto in alcuni processi biologici di base, inclusi la regolazione dello sviluppo dell'epitelio, la modulazione del fenotipo metabolico e la stimolazione dell'immunità innata. In aggiunta, protegge l'organismo dai patogeni esterni attraverso la colonizzazione competitiva o la produzione di agenti antimicrobici (2,26,27) (Tabella 2).

Si stima che il microbiota intestinale umano sia composto da oltre 35 000 specie batteriche, raggruppate in pochi *phyla* e in grado di esprimere oltre 10 milioni di geni non ridondanti (28,29). I *phyla* dominanti sono: Firmicutes (60-80%, batteri Gram-positivi con più di 200 generi, di cui i più importanti sono: Ruminococcus, Clostridium, Eubacterium, Lactobacillus, Faecalibacterium, Roseburia e Mycoplasma) e Bacteroidetes (20-30%, batteri Gram-negativi a cui appartengono i generi Bacteroides, Prevotella e Xylanibacter). I seguenti *taxa* sono presenti in proporzioni minori: Actinobacteria (<10%, batteri Gram-negativi a cui appartiene il genere Bifidobacterium), Proteobacteria (<1%, batteri Gram-negativi a cui appartengono i generi Escherichia, Desulfovibrio ed Enterobacteriaceae) e Verrucomicrobia (<1%, batteri Gram-negativi a cui appartengono i generi Akkermansia, Fusobacteria e Cyanobacteria). La composizione e le concentrazioni luminali del microbiota differiscono nelle varie regioni dell'apparato digerente (27). Più nello specifico, è ormai noto che i *phyla* Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria sono predominanti nello stomaco umano, mentre Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes si trovano frequentemente nel colon (29). I membri del genere Bacteroides, in particolare, partecipano al metabolismo dei carboidrati, determinando la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), come butirrato, acetato e propionato, e gas (27,28,30) (Tabella 2).

Diversi fattori (dieta, farmaci quali antibiotici, inibitori della pompa protonica, antinfiammatori non steroidei, supplementazione marziale, metotrexato, metformina, stress cronico e infezioni del tratto gastrointestinale) possono alterare la composizione del microbiota intestinale determinando una transizione da microrganismi simbiotici a potenziali patogeni (27). In particolare, il rapporto tra Bacteroidetes e Firmicutes, e l'abbondanza relativa di alcuni generi considerati "benefici" come Akkermansia e Bifidobacterium rispetto

a anaerobi facoltativi, come *Escherichia coli*, sono stati proposti per la definizione di "enterotipi" microbici associati ad un maggiore o minor rischio di sviluppare specifiche patologie (31).

La disbiosi del microbiota intestinale, infatti, è stata associata a numerose patologie, tra cui malattie autoimmuni, infiammatorie croniche intestinali, metaboliche e cardiovascolari (obesità, diabete e aterosclerosi), patologie epatiche e infezioni batteriche (26,27,32,33) (Tabella 2). In aggiunta, alterazioni del microbiota intestinale sono state associate anche ad alcuni tipi di tumori, disturbi psichiatrici (come disturbi dello spettro autistico, schizofrenia e disturbo depressivo maggiore) e a patologie del sistema nervoso centrale (come la sclerosi multipla, l'Alzheimer e il morbo di Parkinson) (27,34). Infatti, l'asse intestino-cervello consiste nella comunicazione bidirezionale tra il sistema gastrointestinale e il sistema nervoso centrale; questa comunicazione svolge un ruolo nell'omeostasi della segnalazione neurale, ormonale e immunologica. In particolare, il microbiota intestinale induce la produzione di molecole di segnalazione bioattive [acidi grassi a catena corta (SCFA), catecolamine, neurotrasmettitori e neuropeptidi] ed è in grado di attivare il sistema immunitario (27,34). D'altra parte, il sistema nervoso centrale invia all'intestino segnali in grado di regolare le funzioni gastrointestinali, come la motilità, la secrezione e la produzione di mucina (27,34). Pertanto, non deve sorprendere che in un numero crescente di patologie neuropsichiatriche siano presenti alterazioni del microbiota intestinale (Tabella 2).

### Apparato respiratorio

Nell'apparato respiratorio la varietà nell'origine embriologica e le caratteristiche strutturali distinte creano microambienti unici per la colonizzazione microbica. La temperatura, il pH, la qualità della mucina, la funzione ciliare, la tensione dell'ossigeno e le risposte immunitarie della mucosa modellano l'ecologia microbica di ciascuno di questi siti. Di conseguenza, le comunità microbiche all'interno delle vie aeree mostrano una variazione biogeografica significativa (35).

È importante sottolineare che lo studio del microbioma del tratto respiratorio inferiore è ostacolato dalla necessità di tecniche di campionamento invasive, come broncoscopie o aspirati tracheali da soggetti intubati. Indubbiamente, i campioni del tratto respiratorio superiore sono di più semplice ottenimento, sebbene sia discutibile quanto tali campioni possano essere rappresentativi delle interazioni ospite/microbi che avvengono nel tratto respiratorio inferiore. L'espettorato indotto è un'altra risorsa per lo studio del microbiota delle basse vie respiratorie; tuttavia, la contaminazione dalla cavità orale, carica di microbi, è un problema da non sottovalutare (36).

Il microbiota polmonare è composto da circa 2000 specie batteriche per cm<sup>2</sup> (37). Il principale contributo alla composizione del microbiota delle vie aeree inferiori sembra essere il microbiota delle vie aeree superiori (35-

37). La densità microbica all'interno dei polmoni è bassa; al contrario, la quantità di batteri nel tratto respiratorio superiore è circa 100-10.000 volte più grande che nel tratto respiratorio inferiore (38).

Il microbiota polmonare di individui sani è costituito da sei *phyla* batterici dominanti: Firmicutes (a cui appartengono i generi *Streptococcus* e *Veillonella*), Bacteroides (a cui appartiene il genere *Prevotella*), Proteobacteria, Fusobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria (a cui appartiene il *Tropheryma whipplei*). La cavità nasale, invece, è dominata dai generi *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Moraxella*, e la cavità orale dai generi *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, e *Corynebacterium* (38).

In condizioni fisiologiche, il microbiota residente nelle vie aeree superiori e inferiori svolge diversi ruoli importanti per lo sviluppo e il mantenimento dell'omeostasi del tratto respiratorio e dell'intero organismo (38). Infatti, uno squilibrio del microbiota delle vie aeree è stato riscontrato in numerose patologie, tra cui fibrosi cistica, fibrosi polmonare idiopatica, bronchiectasie, asma, sarcoidosi, broncopneumopatia cronica ostruttiva, infezioni virali e rinosinusite cronica (35-38,40,41) (Tabella 2). In particolare, tali patologie sono spesso caratterizzate da un aumento della carica batterica totale e dalla presenza di alcune specie dominanti, come: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia spp.* nella fibrosi cistica; *Moraxella*, *Haemophilus* e *Neisseria* nell'asma; e *Haemophilus*, *Veillonella*, *Streptococcus* e *Neisseria* nella fibrosi polmonare idiopatica (36).

### Cute

La pelle, rappresentando il rivestimento del nostro corpo, costituisce una vera e propria barriera rispetto all'ambiente esterno (42,43): anche se esposta alla colonizzazione ambientale, funge da filtro selettivo, in gran parte inadatto alla colonizzazione permanente da parte di molti microrganismi (44). Ciononostante, un gruppo eterogeneo di batteri, funghi e virus costituisce il microbiota cutaneo, per una presenza stimata di circa un milione di batteri/cm<sup>2</sup> (42).

La composizione quali/quantitativa del microbiota cutaneo è caratterizzata da una grande variabilità inter- e intra-individuale; infatti, diversi fattori, quali umidità, temperatura, pH, presenza di follicoli piliferi e/o le ghiandole sebacee, creano specifici microambienti caratterizzati da una differente flora residente (42,45, 46). È noto che almeno 19 *phyla* fanno parte del microbioma batterico della pelle, di cui i principali sono Actinobacteria (51,8%), Firmicutes (24,4%), Proteobacteria (16,5%) e Bacteroidetes (6,3%) (43,45). Inoltre, è importante sottolineare che le attuali tecniche di rilevamento microbico hanno dimostrato che i batteri non sono presenti solo sulla superficie della pelle, ma si trovano anche negli strati più profondi fino al derma e al tessuto adiposo sottocutaneo (44).

**Tabella 2**

Principali caratteristiche del microbiota umano nei vari distretti corporei e principali patologie associate ad uno stato di disbiosi.

Distretto corporeo	Biodiversità	Funzioni	Taxa dominanti	Patologie associate
Apparato Digerente	Alta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estrazione di energia dagli alimenti</li> <li>- Modulazione dello stimolo dell'appetito</li> <li>- sintesi di vitamine (folati, vitamina K, biotina, riboflavina, cobalamina e altre vitamine del gruppo B)</li> <li>- Sintesi di amminoacidi</li> <li>- Biotrasformazione degli acidi biliari</li> <li>- Aumento della biodisponibilità dei minerali</li> <li>- Metabolismo di specifiche molecole (inclusi gli xenobiotici)</li> <li>- Regolazione dello sviluppo dell'epitelio intestinale</li> <li>- Modulazione del fenotipo metabolico</li> <li>- Stimolazione dell'immunità innata</li> <li>- Protezione dai patogeni esterni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Firmicutes (60-80%)</li> <li>- Bacteroidetes (20-30%)</li> <li>- Actinobacteria (&lt;10%)</li> <li>- Proteobacteria (&lt;1%)</li> <li>- Verrucomicrobia (&lt;1%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obesità (26,32)</li> <li>- Diabete (26)</li> <li>- Celiachia (33)</li> <li>- Malattie infiammatorie croniche intestinali (Crohn e rettocolite ulcerosa) (53,54)</li> <li>- Malattia da reflusso gastroesofageo (55)</li> <li>- Disturbi dello spettro autistico (26, 56)</li> <li>- Schizofrenia (56)</li> <li>- Disturbo depressivo maggiore (26)</li> <li>- Sclerosi multipla (57)</li> <li>- Alzheimer (3,27)</li> <li>- Morbo di Parkinson (58)</li> <li>- Tumore gastrico (29)</li> <li>- Epatocarcinoma (29)</li> <li>- Adenocarcinoma pancreatico (29)</li> <li>- Cancro del colonretto (29)</li> </ul>
Apparato Respiratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bassa nei polmoni</li> <li>- Alta nelle vie respiratorie superiori</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protezione dai patogeni esterni</li> <li>- Sviluppo e modulazione del sistema immunitario</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Firmicutes</li> <li>- Bacteroides</li> <li>- Proteobacteria</li> <li>- Fusobacteria</li> <li>- Acidobacteria</li> <li>- Actinobacteria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibrosi cistica (36,38)</li> <li>- Fibrosi polmonare idiopatica (36)</li> <li>- Bronchiectasie (36,38)</li> <li>- Asma (35,37-39)</li> <li>- Sarcoidosi (41)</li> <li>- Broncopneumopatia cronica ostruttiva (38)</li> <li>- Infezioni virali (37,38)</li> <li>- Rinosinusite cronica (39,40)</li> </ul>
Cute	Alta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protezione dai patogeni esterni</li> <li>- Maturazione e omeostasi dell'immunità cutanea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actinobacteria (51,8%)</li> <li>- Firmicutes (24,4%);</li> <li>- Proteobacteria (16,5%)</li> <li>- Bacteroidetes (6,3%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dermatite atopica (42,44-47)</li> <li>- Psoriasi (42,44-47)</li> <li>- Acne vulgaris (42,44-47)</li> <li>- Forfora (42,44-47)</li> <li>- Lesioni a lenta cicatrizzazione (42,44-47)</li> <li>- Idrosadenite suppurativa (42,44-47)</li> <li>- Ferite cutanee croniche (42,44-47)</li> </ul>
Apparato Urogenitale	Bassa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protezione dai patogeni esterni</li> <li>- Modulazione del sistema immunitario</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lactobacillus (F)</li> <li>- Gardnerella (F)</li> <li>- Corynebacterium (M)</li> <li>- Staphylococcus (M)</li> <li>- Streptococcus (M)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incontinenza urinaria (59)</li> <li>- Cistite (59)</li> <li>- Infezioni croniche delle vie urinarie (52,59)</li> <li>- Cancro della vescica (49)</li> <li>- Carcinoma renale (49)</li> <li>- Endometriosi (51)</li> <li>- Vaginosi (51)</li> <li>- Carcinoma della cervice uterina (51,60)</li> <li>- Carcinoma endometriale (51,60)</li> <li>- Carcinoma ovarico (60)</li> <li>- Infertilità (51,52)</li> <li>- Iperplasia prostatica benigna (48)</li> <li>- Cancro della prostata (48,50)</li> </ul>

F, Femmine; M, Maschi

Da un punto di vista funzionale, è noto che i batteri cutanei commensali producono molecole con proprietà antimicrobiche in grado di limitare la crescita dei patogeni cutanei (42). I microbi residenti nella pelle, inoltre, svolgono un ruolo importante nella maturazione e nell'omeostasi dell'immunità cutanea (46).

Alterazioni del microbiota cutaneo sono state descritte in associazione con numerose patologie, incluse dermatite atopica, psoriasi, acne vulgaris, forfora, lesioni a lenta cicatrizzazione, idrosadenite suppurativa (42,44-47). In particolare, la crescita eccessiva dello *Staphylococcus aureus*, e la concomitante riduzione dello *Staphylococcus epidermidis*, è una caratteristica riscontrata in diverse patologie della cute (44).

Infine, oltre alle classiche patologie cutanee, è stato dimostrato che i microrganismi che colonizzano la pelle influenzano anche la guarigione delle ferite croniche prevalenti nelle popolazioni anziane o nei pazienti affetti da diabete e/o obesità (47) (Tabella 2).

### Apparato uro-genitale

Storicamente, la vescica era stata considerata sterile; tuttavia, studi recenti hanno rivelato la presenza di microrganismi anche in questo distretto corporeo, aprendo la strada ad ulteriori indagini volte a definire il ruolo del microbiota urinario in condizioni fisiologiche e in associazione a varie patologie (48). Come già discusso anche per le vie aeree inferiori, lo studio del microbiota urinario risente molto della difficoltà di ottenere campioni rappresentativi dei diversi distretti (48). Infatti, dal momento che la maggior parte degli studi è stata eseguita utilizzando urina e/o urina cateterizzata, resta difficile stabilire quali parti del tratto urinario siano colonizzate e quali specie provengano da altri distretti (49). Inoltre, non va sottovalutata la possibilità di contaminazioni da parte del microbiota cutaneo e/o vaginale (49).

Esiste una grande differenza nella composizione del microbiota urogenitale maschile e femminile, quest'ultimo essendo caratterizzato in generale da una minore biodiversità (48). In particolare, il microbiota urogenitale femminile è caratterizzato dalla presenza dei *phyla* Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Fusobacteria, ma è largamente predominato dai generi *Lactobacillus* e *Gardnerella*; i generi *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* sono, invece, più abbondanti nel microbiota urogenitale maschile (49,50).

Questi microbi residenti contribuiscono al mantenimento dello stato di salute e le loro alterazioni sono state associate a diverse patologie sia nell'uomo che nella donna (48-52).

Infine, è importante sottolineare che il microbiota del sistema riproduttivo femminile e maschile non solo sono importanti per la salute dell'individuo, ma possono avere un ruolo nella fertilità e influenzare lo sviluppo

successivo del microbiota nel nascituro (51, 52) (Tabella 2).

### CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Negli ultimi anni, lo sviluppo e la diffusione delle tecniche di NGS ha permesso lo studio di comunità microbiche con un livello di risoluzione non immaginabile in precedenza. Di conseguenza, le conoscenze relative al ruolo e alle funzioni del microbiota umano in vari distretti corporei sono aumentate, permettendo di assegnare al microbiota ruoli fondamentali nello sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi corporea, anche in relazione a varie fasi della vita. D'altra parte, è ormai ben noto che alterazioni quali/quantitative del microbiota sono state associate a numerose patologie e questa tendenza è in aumento. Dal momento che il microbiota può essere modificato con interventi mirati, la definizione della sua composizione in condizioni fisiologiche e patologiche acquisisce un'importanza cruciale per lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e/o di approcci terapeutici finalizzati alla manipolazione del microbiota. In questo contesto, la definizione di protocolli standardizzati e di linee guida comuni, e dunque il ruolo della Medicina di Laboratorio, appare fondamentale per la diffusione di analisi di metagenomica in contesti diagnostici e acquisirà una rilevanza maggiore nel prossimo futuro. In particolare, l'analisi del 16S rRNA batterico sta già mostrando la sua potenziale utilità in ambito diagnostico e, attraverso la manipolazione del microbioma, potrà diventare uno strumento prognostico e terapeutico nel prossimo futuro.

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. Araos R, D'Agata EMC. The human microbiota and infection prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019;40:585-9.
2. D'Argenio V. Human microbiome acquisition and bioinformatic challenges in metagenomic studies. *Int J Mol Sci* 2018;19:383.
3. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. *Biochim Clin* 2019;43:435-48.
4. D'Argenio V. The Prenatal Microbiome: A new player for human health. *High Throughput* 2018;7:38.
5. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, et al. Role of the microbiome in human development. *Gut* 2019;68:1108-14.
6. Gilbert J, Blaser MJ, Caporaso JG, et al. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* 2018; 24:392-400.
7. Malla MA, Dubey A, Kumar A, et al. Exploring the human microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. *Front Immunol* 2019;9:2868.

8. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte I: termini generali. *Biochim Clin* 2019;43:90-105.
9. Kuntal BK, Mande SS. Visual exploration of microbiome data. *J Biosci* 2019;44:119.
10. Lagier JC, Dubourg G, Million M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:540-50.
11. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015;3:31.
12. Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, et al. Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci Rep* 2018;8:5143.
13. Chen MX, Wang SY, Kuo CH, et al. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *J Formos Med Assoc* 2019;118 Suppl 1:S10-S22.
14. Koedooder R, Mackens S, Budding A, et al. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum Reprod Update* 2019;25:298-325.
15. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annu Rev Pathol* 2019;14:319-38.
16. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for analysis of the microbiome. *Dig Dis Sci* 2020;65:674-85.
17. Davidson RM, Epperson LE. Microbiome sequencing methods for studying human diseases. *Methods Mol Biol* 2018;1706:77-90.
18. Schriefer AE, Cliften PF, Hibberd MC, et al. A multi-amplicon 16S rRNA sequencing and analysis method for improved taxonomic profiling of bacterial communities. *J Microbiol Methods* 2018;154:6-13.
19. Ranjan R, Rani A, Metwally A, et al. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;469:967-77.
20. Xu J. Fungal DNA barcoding. *Genome* 2016;59:913-32.
21. Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinform Biol Insights* 2016;10:19-25.
22. Quince C, Walker AW, Simpson JT, et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol* 2017;35:833-44.
23. Claesson MJ, Clooney AG, O'Toole PW. A clinician's guide to microbiome analysis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:585-95.
24. Laudadio I, Fulci V, Stronati L, et al. Next Generation Metagenomics. Methodological challenges and opportunities. *OMICS* 2019;23:327-33.
25. D'Argenio V. The High-Throughput analyses era: are we ready for the data struggle? *High Throughput* 2018;7:8.
26. Altveş S, Yildiz HK, Vural HC. Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. *Biosci Microbiota Food Health* 2020;39:23-32.
27. Szablewski L. Human gut microbiota in health and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018;62:549-60.
28. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015;21:8787-803.
29. Meng C, Bai C, Brown TD, et al. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2018;16:33-49.
30. Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018;361:k2179.
31. Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, et al. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. *Nutrients* 2019;11:1613.
32. Nardelli C, Granata I, D'Argenio V, et al. Characterization of the duodenal mucosal microbiome in obese adult subjects by 16S rRNA sequencing. *Microorganisms* 2020;8:485.
33. Iaffaldano L, Granata I, Pagliuca C, et al. Oropharyngeal microbiome evaluation highlights *Neisseria* abundance in active celiac patients. *Sci Rep* 2018;8:11047.
34. D'Argenio V, Sarnataro D. Microbiome influence in the pathogenesis of prion and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:4704.
35. Ver Heul A, Planer J, Kau AL. The human microbiota and asthma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019;57:350-63.
36. Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat Immunol* 2019;20:1279-90.
37. Pulvirenti G, Parisi GF, Giallongo A, et al. Lower airway microbiota. *Front Pediatr* 2019;7:393.
38. Budden KF, Shukla SD, Rehman SF, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir Med* 2019;7:907-20.
39. Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, et al. The role of lung and gut microbiota in the pathology of asthma. *Immunity* 2020;52:241-55.
40. Kumpitsch C, Koskinen K, Schöpf V, et al. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biol* 2019;17:87.
41. D'Argenio V, Casaburi G, Precone V, et al. A common microbial signature is present in the lower airways of interstitial lung diseases including sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2018;35:354-62.
42. Balato A, Cacciapuotì S, Di Caprio R, et al. Human microbiome: composition and role in inflammatory skin diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2019;67:1-18.
43. Cundell AM. Microbial ecology of the human skin. *Microb Ecol* 2018;76:113-20.
44. Lunjani N, Hlela C, O'Mahony L. Microbiome and skin biology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2019;19:328-33.
45. Schneider AM, Nelson AM. Skin microbiota: Friend or foe in pediatric skin health and skin disease. *Pediatr Dermatol* 2019;36:815-22.
46. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature* 2018;553:427-36.
47. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:143-55.
48. Bajic P, Dornbier RA, Doshi CP, et al. Implications of the genitourinary microbiota in prostatic disease. *Curr Urol Rep* 2019;20:34.
49. Markowski MC, Boorjian SA, Burton JP, et al. The microbiome and genitourinary cancer: A collaborative review. *Eur Urol* 2019;75:637-46.
50. Porter CM, Shrestha E, Peiffer LB, et al. The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2018;21:345-54.
51. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, et al. Microbiota and human reproduction: the case of female infertility. *High Throughput* 2020;9:12.
52. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, et al. Microbiota and human reproduction: the case of male infertility. *High Throughput* 2020;9:10.
53. D'Argenio V, Precone V, Casaburi G, et al. An altered gut microbiome profile in a child affected by Crohn's disease normalized after nutritional therapy. *Am J Gastroenterol* 2013;108:851-2.
54. Alshehri D, Saadah O, Mosli M, et al. Dysbiosis of gut microbiota in inflammatory bowel disease: Current therapies and potential for microbiota-modulating therapeutic approaches. *Bosn J Basic Med Sci* 2020. doi: 10.17305/bjbm.2020.5016.

55. Park CH, Lee SK. Exploring esophageal microbiomes in esophageal diseases: a systematic review. *J Neurogastroenterol Motil* 2020;26:171-9.
56. Eltokhi A, Janmaat IE, Genedi M, et al. Dysregulation of synaptic pruning as a possible link between intestinal microbiota dysbiosis and neuropsychiatric disorders. *J Neurosci Res* 2020;98:1335-69.
57. Montgomery TL, Künstner A, Kennedy JJ, et al. Interactions between host genetics and gut microbiota determine susceptibility to CNS autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:27516-27.
58. Zhang F, Yue L, Fang X, et al. Altered gut microbiota in Parkinson's disease patients/healthy spouses and its association with clinical features. *Parkinsonism Relat Disord* 2020;81:84-8.
59. Bhide A, Tailor V, Khullar V. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome and recurrent urinary tract infection and the potential role of the urinary microbiome. *Post Reprod Health* 2020;26:87-90.
60. Alizadehmohajer N, Shojaeifar S, Nedaeinia R, et al. Association between the microbiota and women's cancers - Cause or consequences? *Biomed Pharmacother* 2020;127:110203.

---

**GLOSSARIO**


---

16rRNA	Componente della subunità 30S del ribosoma procariotico. Usato a scopi filogenetici per l'elevata variabilità tra taxa differenti
Metabolomica	Branca delle scienze "omiche" che studia i metaboliti prodotti in determinati processi cellulari
Microbioma	Insieme dei genomi di tutti i microrganismi che costituiscono un determinato microbiota
Next Generation Sequencing (NGS)	Insieme di tecnologie in grado di sequenziare contemporaneamente milioni di sequenze target e caratterizzate, pertanto, da un'elevata produttività in termini di basi nucleotidiche sequenziate/seduta analitica
RegioniTrascritte Interne (ITS)	Tipo di sequenziamento NGS in cui non si effettua una selezione a priori delle regioni genomiche target da sequenziare
Sequenziamento Shotgun	Regione non codificante del DNA ribosomiale usata per studi filogenetici, in quanto caratterizzata da un elevato tasso di mutazioni anche tra specie vicine. Negli eucarioti esistono 2 tipi di ITS chiamate ITS1 e ITS2
Studio longitudinale	Tipologia di studio scientifico in cui un determinato parametro viene valutato nel corso del tempo negli stessi individui
Studio trasversale	Tipologia di studio scientifico descrittivo in cui uno o più parametri vengono valutati in un determinato momento in più individui per effettuare delle successive comparazioni
Taxon (unità tassonomica)	Raggruppamento di organismi associati in base a caratteristiche comuni e che possono essere organizzati in una scala gerarchica in base alla similarità. In biologia, le categorie tassonomiche alle quali vengono associati i diversi <i>taxa</i> sono, nell'ordine: Regno, Phylum, Classe, Ordine, Famiglia, Genere, Specie e Sottospecie

---

## Emoglobinopatie: quadri clinici e ruolo del laboratorio tra realtà e prospettive future

Giovanni Ivaldi<sup>1</sup>, Giuseppina Barberio<sup>2</sup>, Maria Domenica Cappellini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Già Laboratorio di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova

<sup>2</sup>UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviso, ULSS2 Marca trevigiana (TV)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano

### ABSTRACT

#### **Hemoglobinopathies: clinical pictures and role of the laboratory between reality and future prospects.**

The term hemoglobinopathies generally includes all the defects of the globin genes. In most of the cases, these defects are transmitted as autosomal recessive patterns and are in the heterozygous state, clinically asymptomatic. A substantial variability in hematological and clinical phenotypes is observed when defects occur in the homozygous state, in heterozygous compounds or are associated with variations in non-globin genes. The marked hematological, molecular and clinical heterogeneity of hemoglobinopathies requires experience and competence for the use of different technologies, the organization of the diagnostic procedures and for the clinical management of patients as well. There is no doubt that the numerous hemoglobin variants and different combinations observed nowadays are the result of migratory movements that have taken place in recent decades with the arrival in Italy and Europe of important numbers of subjects, mostly from territories where hemoglobin defects are particularly present. The laboratory tests, defined as 1<sup>st</sup> level or primary screen, are still the fundamental step of the diagnostic approach to hemoglobinopathies and cannot be avoided. However, confirmatory tests and molecular characterization are always required for a diagnostic approach characterized by the combined use of hematological, biochemical and molecular techniques. The laboratory will thus be able to provide the clinician with adequate elements for patient management, in the different contexts of prevention, counseling or therapeutic choices. The laboratory dedicated to hemoglobinopathies is oriented towards precision medicine by acting on levels of increasing complexity, thus providing useful knowledge for the benefit of personalized medicine.

### INTRODUZIONE

Con il termine emoglobinopatie si definiscono in modo generico tutti i difetti dei geni globinici. Nella maggior parte dei casi tali difetti si trasmettono per via autosomica recessiva e sono clinicamente asintomatici allo stato eterozigote. Anche allo stato omozigote o con alcuni composti eterozigoti o associati a variazioni di geni non-globinici, si possono osservare fenotipi ematologici e clinici molto variabili. I difetti talassemici e la drepanocitosi hanno un'elevata prevalenza in quelle aree geografiche in cui la malaria è endemica, in quanto tali condizioni rappresentano per la popolazione un vantaggio, dal momento che ostacolano l'infestazione da Plasmodi, in particolare da *Plasmodium falciparum* (1,2). Oggigiorno, in particolare la drepanocitosi o anemia falciforme

rappresenta un problema emergente nel mondo e anche in Italia (3-5). Difetti molto più rari sono in grado di produrre anemie emolitiche significative, alterare i legami e il trasporto dell'ossigeno, manifestare fenotipi talassemici intermedi allo stato eterozigote, evidenziando un comportamento "semi-dominante". Alcuni parametri eritrocitari e biochimici consentono al laboratorio clinico di escludere, diagnosticare o ipotizzare la presenza di molti difetti talassemici o di varianti strutturali. Nel caso delle varianti dell'emoglobina (Hb), oltre la metà di quelle che possono essere causate dalla sostituzione di singoli amminoacidi delle catene globiniche, possono essere osservate semplicemente con i sistemi separativi oggi in uso: elettroforesi capillare e HPLC (6). Si definisce quindi genericamente "portatore sano" un soggetto clinicamente asintomatico che i risultati di esami specifici di base

Corrispondenza a: Giovanni Ivaldi, Già Laboratorio di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova, Tel 3356772425, E-mail g.ivaldi@live.it

Ricevuto: 25.11.2020

Revisionato: 08.12.2020

Accettato: 15.12.2020

Pubblicato on-line: 26.02.2021

DOI: 10.19186/BC\_2020.104

classificano, nella maggior parte dei casi, come eterozigote per un difetto emoglobinico. La marcata eterogeneità ematologica, molecolare e clinica delle emoglobinopatie richiede sempre più esperienza, competenza, utilizzo di tecnologie raffinate nonché livelli organizzativi elevati, sia a livello di diagnostica di laboratorio che nella gestione clinica dei malati. Le variazioni e le combinazioni che si osservano oggi sono anche il risultato dei movimenti migratori avvenuti negli ultimi decenni e che hanno interessato l'Italia e l'Europa con un numero importante di soggetti provenienti in gran parte da territori nei quali i difetti emoglobinici sono particolarmente presenti (7,8). Gli esami di laboratorio definiti di 1 livello costituiscono, ancor oggi, il momento fondamentale dell'approccio diagnostico alle emoglobinopatie da cui non si può prescindere. Tuttavia, esami di conferma e caratterizzazioni molecolari saranno sempre necessari, con un approccio diagnostico contrassegnato dall'utilizzo combinato di tecniche ematologiche, biochimiche e molecolari (9). Il laboratorio dovrà essere sempre più in grado di fornire al clinico elementi appropriati per la gestione del portatore e/o del malato, nell'ambito della prevenzione, della consulenza o del percorso terapeutico (10).

Il laboratorio che si occupa della diagnostica delle emoglobinopatie, agendo a diversi livelli di complessità, in contesti che richiedono appropriatezza e adesione a linee guida o a nuove raccomandazioni, persegue gli obiettivi di una medicina di precisione fornendo ai clinici strumenti utili per una medicina sempre più personalizzata (11,12).

### I QUADRI CLINICI: DIAGNOSI, CLASSIFICAZIONE E PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Dal punto di vista clinico, nell'ambito delle emoglobinopatie vanno distinte le forme legate ad un difetto quantitativo della produzione delle catene globiniche (sindromi talassemiche) rispetto alle forme dovute ad un difetto qualitativo delle catene globiniche (varianti emoglobiniche). Le prime sono clinicamente più rilevanti, mentre solo alcune delle varianti hanno un impatto clinico importante; tra queste vanno senza dubbio considerate l'HbS (anemia a cellule falciformi o drepanocitosi) e l'HbC. Per quanto concerne le sindromi talassemiche, poiché l'emoglobina dopo la nascita e nella vita adulta è costituita per circa il 97% da catene alfa e beta, è evidente che l'espressione fenotipica dipenderà dal deficit di catene beta ( $\beta$ ) ( $\beta$ -talassemie) o di catene alfa ( $\alpha$ ) ( $\alpha$ -talassemie). La sintesi delle catene  $\beta$  è controllata da 2 geni sul cromosoma 11 (1 gene per ciascun allele) mentre la sintesi delle catene  $\alpha$  è controllata da 4 geni localizzati sul cromosoma 16 (2 geni per ciascun allele). Da questo si deduce che la probabilità di avere fenotipi clinici importanti sarà più probabile per le forme  $\beta$  (13).

#### Le Beta Talassemie

Poiché il difetto è autosomico recessivo la classificazione clinica usata in passato includeva:

- il soggetto "carrier" o portatore sano o microcitemico (geneticamente eterozigote);
- il soggetto malato con talassemia major o morbo di Cooley (geneticamente omozigote o doppio eterozigote per mutazioni  $\beta$ -marcate);
- il soggetto con talassemia intermedia (geneticamente doppia eterozigosi per mutazioni  $\beta$  lievi, lievi/marcate o altri composti genetici con co-ereditarietà  $\beta$  e  $\alpha$ ) (14). Questa definizione si applicava a tutte le forme di  $\beta$  talassemia clinicamente rilevanti ma non così marcate da richiedere regolare terapia trasfusionale come le forme major.

Questo tipo di classificazione implicava la conoscenza delle numerose mutazioni identificate nel gene  $\beta$  (oltre 400) (15), e non facilitava l'approccio clinico. Per questo, da alcuni anni la classificazione clinica delle sindromi talassemiche  $\beta$  e  $\alpha$ , è stata rivista da un gruppo di esperti alla luce del fabbisogno trasfusionale. Pertanto la classificazione attuale più comunemente usata distingue le talassemie in forme Trasfusione Dipendenti (TDT) e non Trasfusione Dipendenti (NTDT) (16) (Figura 1).

La fisiopatologia delle sindromi  $\beta$ -talassemiche dipende sostanzialmente dall'entità dello sbilanciamento tra le catene  $\alpha$  e  $\beta$ : quanto maggiore è il deficit di catene  $\beta$ , tanto maggiore sarà l'eccesso di catene  $\alpha$  libere che precipitano all'interno degli eritroblasti in forma di emicromi determinando un danno apoptotico a cui consegue una eritropoiesi inefficace. Questa è responsabile di anemia, emolisi e aumentato assorbimento del ferro. La gravità di queste manifestazioni dipende dal grado di eritropoiesi inefficace, per cui la severità del genotipo certamente condiziona l'espressione fenotipica; questa tuttavia può essere ulteriormente aggravata o migliorata da concomitanti modificatori genetici o acquisiti (17). Se non si interviene terapeuticamente, l'anemia cronica, l'emolisi e l'aumentato assorbimento di ferro determinano una serie di morbidità quali: espansione ossea e comparsa di masse di eritropoiesi extramidollare, splenomegalia, calcolosi della colecisti, danno delle ghiandole endocrine (ipogonadismo), danno epatico e cardiaco per ipossia e accumulo di ferro. Questa sequenza di eventi patologici può essere controllata sopprimendo l'attività midollare talassemica attraverso le trasfusioni di sangue. Sulla base di questa osservazione, fin dagli anni '70 è stata adottata la terapia trasfusionale per le forme di  $\beta$  talassemia severa. Un regime trasfusionale corretto prevede 2 o 3 unità di emazie concentrate ogni 15/21 giorni ai fini di mantenere un livello di emoglobina pre-trasfusionale tra 95 e 105 g/L. Questo approccio terapeutico riduce significativamente l'eritropoiesi inefficace ma comporta purtroppo accumulo di ferro in quanto ogni unità di sangue trasfuso provoca un accumulo corporeo di circa 200 mg di ferro. L'uomo infatti non possiede alcun meccanismo fisiologico per l'eliminazione del ferro in eccesso (18,19) che si accumula così a livello di diversi organi, in particolare organi endocrini, fegato e cuore

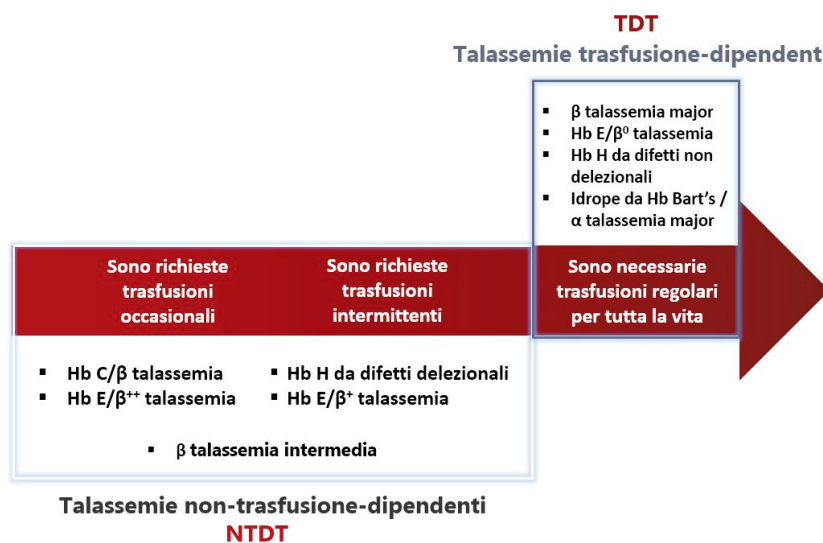


Figura 1

Schema della classificazione clinica delle sindromi talassemiche in rapporto al fabbisogno trasfusionale

con conseguenti patologie ferro-correlate. Per evitare l'effetto tossico del ferro in eccesso è indispensabile, parallelamente alla terapia trasfusionale, implementare una terapia ferro-chelante. Attualmente sono disponibili tre diversi ferrochelanti:

- Deferoxamina, efficace se infusa sottocute mediante pompa per 8-10 ore al giorno
- Deferiprone orale, 75/100 mg/Kg in tre somministrazioni giornaliere
- Deferasirox orale, 20-40 mg/kg nella formulazione solubile oppure 7-14 mg/kg nella formulazione a compresse, in singola somministrazione giornaliera.

La terapia con Deferasirox nella formulazione compresse è oggi la terapia chelante di prima scelta ed è associata ad un significativo miglioramento dell'aderenza dei pazienti ad una terapia "salva vita" che deve essere praticata giornalmente e per tutta la vita (20,21).

Nel contesto delle  $\beta$ -talassemie vengono incluse anche le forme di HbE/ $\beta$ -talassemia che sono particolarmente frequenti nel sud-est asiatico. L'HbE è una variante della catena  $\beta$ -globinica che si caratterizza anche per un difetto quantitativo; pertanto l'associazione con un difetto talassemico  $\beta$ , determina quadri clinici la cui gravità può variare da forme gravi a forme intermedie in funzione del difetto  $\beta$  associato (22).

### Le Alfa Talassemie

Le forme clinicamente rilevanti di  $\alpha$ -talassemia risultano dal coinvolgimento di almeno 3 geni  $\alpha$ . Quando solo 2 geni  $\alpha$  sono interessati o da mutazioni puntiformi o da delezioni, ne consegue un fenotipo lieve caratterizzato da modesta anemia microcitica che non richiede terapia se non un supporto di acido folico a periodi alterni. In questi casi, come per il portatore di  $\beta$ -talassemia è importante la consulenza genetica. Nel

caso di 3 geni  $\alpha$  difettosi si ha la malattia da HbH (HbH disease), nella quale il quadro clinico è molto simile alle forme di talassemia intermedia e infatti queste forme vengono inserite nella definizione di NTDT (Figura 1). In genere presentano splenomegalia, emoglobina tra 80-110 g/L con una lieve componente emolitica. Il supporto trasfusionale è in genere limitato a particolari situazioni quali gravidanza, interventi chirurgici o infezioni. La forma grave di  $\alpha$ -talassemia si associa ad idrope fetale ed è la conseguenza di 4 geni  $\alpha$  difettosi. Nella maggior parte dei casi si osserva morte intrauterina. Recentemente è stato proposto il tentativo di trasfusione intrauterina per consentire al feto la sopravvivenza e proseguire poi una terapia post-partum. I dati disponibili sono ancora scarsi e richiedono ulteriori sviluppi (23).

### Prospettive terapeutiche per le sindromi talassemiche

Come accennato nei paragrafi precedenti, la terapia convenzionale per le TDT si avvale della trasfusione di emazie concentrate e di terapia ferro-chelante. Questo approccio terapeutico è molto impegnativo e soprattutto deve essere mantenuto per tutta la vita (18). La terapia convenzionale per le forme NTDT è variabile in funzione delle necessità e delle complicanze cliniche; tuttavia anche in questo caso impatta sulla qualità di vita dei pazienti (19). Nella seconda metà degli anni ottanta è stato introdotto il trapianto di midollo come potenziale terapia curativa della talassemia. In oltre 30 anni sono stati prodotti molti risultati positivi con un progressivo miglioramento del condizionamento e della risposta terapeutica. Tuttavia i risultati globali da registro europeo suggeriscono che la risposta migliore intesa come guarigione dalla talassemia, si ottiene con l'utilizzo di un donatore HLA identico e in soggetti talassemici di età <14 anni (24). Per questi motivi, da anni, numerosi

gruppi di ricercatori hanno orientato la propria ricerca allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per i pazienti talassemici. Ad oggi sono in fase di sviluppo avanzato tre diversi obiettivi terapeutici: terapia genica/genome editing, riduzione dell'eritropoiesi inefficace, modulazione del metabolismo del ferro (25,26).

### Terapia genica

Si tratta di un approccio *ex-vivo* nel quale viene inserito nelle cellule staminali del paziente il gene deficitario o mal funzionante. Le cellule staminali del paziente stesso vengono prelevate dopo stimolazione con fattori di crescita e plerixafor<sup>1</sup>, indirizzate al laboratorio che provvederà alla transfezione con il gene  $\beta$  veicolato da un vettore lentivirale, e successivamente, dopo ablazione del midollo del paziente con terapia mielo-soppressiva, le cellule transfettate vengono reinfuse nel paziente stesso. La talassemia, sul piano teorico, è il modello ideale per la terapia genica in quanto si tratta di una malattia monogenica per cui l'introduzione del singolo gene responsabile della malattia dovrebbe essere curativo. Purtroppo non è questo il caso poiché interagiscono vari fattori che condizionano l'espressione genica (microambiente, fattori di crescita, sintesi di citochine) e sono stati necessari parecchi anni per raggiungere una modalità di terapia genica con una buona efficacia. Attualmente sono in corso numerosi studi clinici di terapia genica di cui il primo "LentiGlobin BB305", ha portato all'autorizzazione condizionata in Europa del prodotto Zynteglo® per pazienti talassemici TDT con genotipo non  $\beta^0/\beta^0$  di età >12 anni che non abbiano un donatore HLA identico per il trapianto di midollo. L'approvazione si basa sui risultati di 2 studi di fase 1-2 di 22 pazienti di cui 15 dopo la terapia genica sono diventati trasfusione indipendenti e i restanti 7 hanno significativamente ridotto il fabbisogno trasfusionale. Risultati analoghi sono stati riportati con un altro vettore dallo studio italiano "Tiget-Thal". La terapia genica è sicuramente molto promettente tuttavia è necessario avere dati di efficacia a più lungo termine e soprattutto sarà necessario definire i criteri di selezione dei pazienti considerando anche le potenziali limitazioni di offerta di questa costosa terapia (27).

### Genome editing

Il "genome editing" è un diverso tipo di terapia molecolare, sempre *ex vivo*, che si basa sul principio "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" o CRISPR-Cas (28) e può avere diversi obiettivi. È in corso uno studio che inattiva il gene *BCL11A* (che codifica per la proteina B-cell lymphoma/leukemia 11A, una proteina regolatrice "zinc-finger type") con l'obiettivo di controllare lo switch dell'emoglobina che avviene nel periodo neonatale e mantenere attiva la sintesi di HbF. Si tratta di uno studio di fase 1-2 tutt'ora in corso, i cui risultati preliminari sono

stati presentati al Congresso dell'European Hematology Association -2020 (EHA 2020, abstract S280) (29).

### Riduzione dell'eritropoiesi inefficace

L'eritropoiesi inefficace come risultato dello sbilanciamento globinico  $\alpha/\beta$  è il fattore principale che domina la fisiopatologia delle sindromi talassemiche e pertanto rappresenta un interessante obiettivo terapeutico. Per molti anni si è cercato di correggere farmacologicamente questa condizione; un tentativo è stato quello di controllare lo switch dell'emoglobina mantenendo attiva la sintesi di HbF mediante idrossiurea (HU) già utilizzata nella drepanocitosi. I risultati sono tuttavia molto eterogenei e non vi sono studi prospettici che provino l'efficacia di HU nell'aumentare la concentrazione dell'emoglobina nelle talassemie (30). Un altro tentativo è stato fatto con inibitori del gene *JAK2* (Ruxolitinib) in quanto *JAK2* è iper-espresso sulle cellule eritroidi e ne altera il differenziamento e la maturazione. È stato portato a termine uno studio clinico i cui risultati però non hanno documentato un'efficacia in termini di correzione dell'anemia, ma solo una riduzione del volume splenico; lo studio è stato pertanto concluso senza indicazioni cliniche (31). Più recentemente, in modo occasionale, è stata identificata una molecola (Luspatercept) che compete con il recettore dell'Activina IIB e in questo modo controlla la sequenza di reazioni che coinvolgendo il complesso SMAD2/SMAD3<sup>2</sup> regolano la fase di maturazione degli eritrociti. I risultati prodotti prima in modelli murini talassemici e successivamente in studi clinici di fase 2 e 3 hanno consentito la registrazione di Luspatercept da parte della Food and Drug Administration (FDA) statunitense e dall'European Medicines Agency (EMA) per la terapia dell'anemia nei pazienti talassemici TDT. In sintesi lo studio BELIEVE di fase 3, randomizzato in doppio cieco in 336 pazienti adulti TDT, ha dimostrato una significativa riduzione del fabbisogno trasfusionale nei pazienti trattati rispetto al gruppo placebo ( $p < 0,001$ ): odds ratio (OR), 5,79; intervallo di confidenza al 95% (IC95%), 2,24-14,97 (32). La terapia è stata ben tollerata e attualmente sono in corso le approvazioni da parte degli organi regolatori nazionali.

### Modulazione del metabolismo del ferro

Studi in modelli murini talassemici hanno dimostrato che modulando la ridistribuzione del ferro corporeo attraverso l'epcidina o il recettore solubile della transferrina o modulando proteine che controllano i livelli di epcidina (TMPS6 – transmembrane serine protease 6, Eritroferrone ecc.) è possibile generare un'eritropoiesi ferro-privata che si associa ad una riduzione delle catene  $\alpha$  in eccesso, per cui l'eritropoiesi efficace prevale su quella inefficace. Ci sono diversi trial clinici di fase 1-2 che hanno avviato gli arruolamenti ma ancora i dati clinici non sono disponibili (25).

<sup>1</sup>Il Plerixafor è un farmaco immunostimolante indicato in combinazione con fattori di crescita per incrementare la mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche nel sangue periferico

<sup>2</sup>Le SMAD sono una classe di proteine che formando complessi funzionano da fattori di trascrizione

## Anemia a cellule falciformi (Sickle Cell Disease-SCD) o Drepanocitosi

La SCD è un'emoglobinopatia conseguente alla presenza della variante S della catena globinica  $\beta$ . L'HbS ha peculiari proprietà biochimiche; infatti polimerizza quando deossigenata formando catene rigide che causano la tipica deformazione a falce delle emazie. La ciclica de-polimerizzazione dell'HbS è responsabile di grave danno ossidativo a carico della membrana eritrocitaria con attivazione di sistemi di trasporto ionico e generazione di eritrociti densi e disidratati (sickle cells). Questi eritrociti giocano un ruolo importante nella patogenesi dei danni d'organo acuti e cronici nella SCD. Infatti, gli eritrociti densi tendono più facilmente a rimanere intrappolati nel microcircolo aderendo alla superficie dell'endotelio vascolare attivato, con rallentamento del flusso ematico e danno loco-regionale di tipo ipossico.

La condizione di eterozigosi in genere non si associa a quadri clinici rilevanti: la percentuale di HbS presente è circa il 30% e non è sufficiente a causare sintomatologia clinica rilevante. Solo recentemente sono comparse in letteratura alcune segnalazioni di casi di soggetti portatori di tratto S che a lungo termine possono sviluppare alcune complicazioni legate a lieve ipossia. Le forme clinicamente rilevanti sono HbS/HbS (omozigosi per la variante), HbS/ $\beta$ Tal (doppia eterozigosi HbS e mutazione  $\beta$ 0-talassemica) e HbS/HbC (doppia eterozigosi per le varianti S e C). In caso di omozigosi, la quota di HbS è superiore al 90% di tutta l'emoglobina (può essere presente una quota di HbF variabile) e pertanto il rischio di falcizzazione degli eritrociti con conseguenti fenomeni vaso-occlusivi ed emolitici, è molto elevato. I quadri clinici della SCD possono presentarsi come eventi acuti (crisi falcemiche) che si caratterizzano o per fenomeni vaso-occlusivi interessanti organi bersaglio come osso, distretto addominale (milza, rene, fegato), polmone, cervello, o per crisi emolitiche, crisi aplastiche o sequestro splenico o epatico. Il dolore è la manifestazione clinica più frequente della SCD e accompagna sempre il quadro clinico di crisi falcemica; richiede un approccio multidisciplinare il cui obiettivo principale è il controllo del sintomo dolore e il sollievo dallo stesso. La sua patogenesi è riconducibile all'azione di differenti meccanismi antalgici di origine somatica, neuropatica e vascolare (33). Negli anni ottanta è stato dimostrato che HU era in grado di ridurre il numero di crisi falcemiche controllando così la severità del quadro clinico nei pazienti con drepanocitosi o talasso-drepanocitosi. Numerosi pazienti assumono cronicamente HU con beneficio, tuttavia l'uso di HU non esclude completamente il rischio di crisi acute che nella maggior parte dei casi portano il paziente a rivolgersi al Pronto Soccorso (34). Le strategie terapeutiche in acuzie si basano sul rapido ed efficace controllo del dolore, sulla riduzione dei livelli di HbS o correzione dei valori di emoglobina totale. Il trattamento del dolore in eventi acuti si basa sull'impiego di farmaci analgesici di

secondo livello "morfino-like" (tramadolo) in associazione con farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) o paracetamolo. L'indicazione ad eseguire terapia trasfusionale è rappresentata dalla necessità di ridurre rapidamente i livelli di HbS o di correggere lo stato di anemizzazione acuta (crisi emolitica o aplastica). Le procedure trasfusionali attuabili in corso di crisi falcemica sono: trasfusione di emazie concentrate o scambio eritrocitario che può essere manuale (salasso  $\rightarrow\leftarrow$  trasfusione) (MEEX) o automatizzato (EEX); quest'ultimo è obbligatorio se i valori di emoglobina totale sono  $>100$  g/L per ridurre il rischio di aumentata viscosità ematica. Una condizione particolare nella quale lo scambio eritrocitario è una indicazione assoluta, è la colestasi intraepatica acuta, che si manifesta con ittero franco associato a sintomatologia algica e aumento della bilirubina totale e delle transaminasi in assenza di anemizzazione acuta; questo quadro clinico può evolvere fatalmente in insufficienza epatica acuta. Un'altra situazione di emergenza in cui è necessario utilizzare la terapia trasfusionale è rappresentata dal sequestro splenico acuto, che si può verificare in età pediatrica anche in assenza di precedente splenomegalia o in giovani adulti affetti da HbS/ $\beta$ Tal con splenomegalia. Questa condizione è invece molto rara nei soggetti giovani adulti con forme HbS/HbS o HbS/HbC, che si caratterizzano per la presenza di asplenia funzionale in seguito a reiterati infarti splenici. Per questo motivo è necessario considerare tutti i pazienti SCD come soggetti immunodepressi, anche se non splenectomizzati. La presenza di sindrome toracica acuta o di eventi cerebrali acuti costituiscono ulteriori complicanze che necessitano di trattamento trasfusionale in regime di acuzie (35).

## Prospettive terapeutiche per la Sickle Cell Disease

Con il miglioramento delle conoscenze dei meccanismi fisiopatologici alla base delle crisi falcemiche, negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi nella ricerca e identificazione di nuovi approcci terapeutici. Voxelotor, L-Glutamina e Crizanlizumab sono tre farmaci recentemente approvati per l'impiego nella SCD, con meccanismi d'azione differenti: Voxelotor agisce prevalentemente sull'idratazione riducendo il fenomeno della falcizzazione, L-Glutamina agisce sullo stress ossidativo e Crizanlizumab agisce prevalentemente sulla disfunzione endoteliale (36,37).

## IL RUOLO DEL LABORATORIO: PERCORSI DIAGNOSTICI E METODOLOGIE

### Le Beta Talassemie

Come già detto, sono oltre 400 le mutazioni note, prevalentemente puntiformi, del gene  $\beta$ -globinico (15) che allo stato eterozigote presentano un fenotipo

talassemico e producono di solito una condizione di portatore sano, asintomatico. Il laboratorio mediante esami specifici che riflettono alcune caratteristiche biochimiche e morfologiche dell'emoglobina e degli eritrociti riesce ad individuare gran parte di queste condizioni consentendo la prevenzione primaria della  $\beta$ -talassemia. Negli anni si sono avvicinati alcuni tentativi di semplificazione degli esami utili alla diagnosi di portatore, soprattutto in contesti con bassa prevalenza di difetti emoglobinici. Gli indici eritrocitari, ottenuti con l'ausilio di strumentazioni sempre più sofisticate, sono stati proposti quali parametri adeguati e sufficienti a individuare una condizione di portatore di  $\beta$ -talassemia (38). È facile osservare tuttavia che i soli indicatori eritrocitari non consentono di differenziare in modo univoco, e in molti casi neanche di supporre, l'eterogeneità clinica associata all'assente o diversamente ridotta sintesi di catene  $\beta$  definite come  $\beta 0-$ ,  $\beta +$ ,  $\beta ++$  o  $\beta +++$ -talassemie (9,39,40).

#### Gli esami di primo livello

**I parametri eritrocitari.** La quantificazione dell'HbA<sub>2</sub> permette di discriminare molte condizioni talassemiche e tuttavia è essenziale considerare in parallelo almeno quattro parametri eritrocitari: il volume cellulare medio (MCV) (parametro ritenuto fondamentale), il contenuto

cellulare medio di emoglobina (MCH), la concentrazione totale di emoglobina e il numero di eritrociti (GR). In Tabella 1 vengono messi a confronto i valori dell'HbA<sub>2</sub> e dell'MCV in presenza di alcune alterazioni dei geni globinici. Tuttavia, occorre ricordare che l'MCV può aumentare in alcune condizioni (carenza di acido folico e vitamina B12, presenza di alcune patologie autoimmuni ed epatiche, sindromi mielodisplastiche, reticolocitosi, abuso di alcol) (41). Inoltre, la  $\beta$ -talassemia eterozigote potrebbe essere co-ereditata con l'alfa talassemia; in particolare nel caso di  $\beta +$ - o  $\beta ++$ -talassemia con 1 o 2 geni alfa non funzionanti si possono produrre valori meno ridotti o anche normali dell'MCV, mentre l'HbA<sub>2</sub> rimane superiore a 3,2%. In tutte queste circostanze la conclusione diagnostica per talassemia può complicarsi, venendo meno la corretta indicazione dell'eventuale microcitosi, propria dei difetti quantitativi globinici (39,42,43). Infine, i quattro parametri eritrocitari e l'HbA<sub>2</sub> potranno a loro volta essere condizionati dall'assetto marziale ed è per questo che la valutazione dei livelli sierici del ferro si rende necessaria in molti casi (44,45). **Emoglobina A<sub>2</sub>.** Oggi è condivisa la necessità di conoscere più parametri e, per quanto possibile, acquisire anche alcuni dati anamnestici del soggetto in esame per consentire una opportuna conclusione diagnostica definitiva o presuntiva di primo livello (46).

**Tabella 1**

Valori indicativi dell'HbA<sub>2</sub> e del Volume Globulare Medio (MCV) in alcune delle condizioni più frequenti nel soggetto adulto asintomatico.

HbA <sub>2</sub> (%)	MCV (fL)	Condizioni
< 2	>78	Delta-Talassemie e Delta-Varianti, Alfa-Varianti, Alfa-Varianti (con Alfa <sup>+</sup> -Talassemia)
	<78	Hb H, Alfa <sup>0</sup> -Talassemie, Alfa-Varianti (con Alfa-Talassemia), carenza marziale
2 – 2,5	>78	Normalità, Alfa <sup>+</sup> -Talassemie, Alfa-Varianti
	<78	Alfa-Talassemie, DeltaBeta-Talassemie, Delta+Beta Talassemie Beta <sup>+</sup> -Talassemie + Delta-Varianti, carenza marziale
2,6 – 3,2	>78	Normalità, Alfa <sup>+</sup> -Talassemie, Beta <sup>++</sup> -Talassemie, Beta-Varianti
	<78	Alfa-Talassemie, DeltaBeta-Talassemie, Beta <sup>++</sup> -Talassemie, Delta+BetaTalassemie, Beta <sup>0</sup> -Talassemie + Delta-Varianti, carenza marziale
3,3 – 4,0	>78	Beta <sup>+</sup> -Talassemie, Beta-Varianti instabili, Triplicazione geni alfa, Effetto di alcuni farmaci
	<78	Beta <sup>+</sup> -Talassemie, Beta Talassemie con Carenza marziale, Beta <sup>0</sup> -Talassemie + Delta-Varianti
> 4,0	>78	Beta-Talassemie atipiche, Beta + Alfa <sup>0</sup> -Talassemie
	<78	Beta <sup>0</sup> -Talassemie

L'HbA<sub>2</sub>, è oggi e rimarrà presumibilmente ancora per molto tempo, l'indicatore centrale e irrinunciabile nella diagnosi di laboratorio della  $\beta$ -talassemia (47,48); una diagnosi che può essere definita, nel soggetto eterozigote, solo dal laboratorio e che nella maggior parte dei casi non ha bisogno di ulteriori approfondimenti o conferme (9). È importante che in ogni caso un commento accompagni gli esiti degli esami eseguiti, per orientare nell'interpretazione sia il soggetto esaminato che il clinico, riportando i limiti, in parte metodologici ma soprattutto interpretativi di tali esami, considerata l'eterogeneità dei difetti talassemici, e includendo eventualmente la necessità di ulteriori indagini (10). Per la determinazione della HbA<sub>2</sub>, abbiamo a disposizione sostanzialmente due diversi approcci metodologici basati rispettivamente sul principio cromatografico (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) e su quello elettroforetico (Capillary Electrophoresis, CE). In entrambi i casi viene sfruttata la differenza di carica elettrica totale delle diverse emoglobine presenti; in particolari condizioni tale differenza produce profili separativi caratteristici. I due principi mostrano capacità risolutive e di migrazione leggermente diverse per quanto riguarda le varianti emoglobiniche, mentre nella quantificazione dell'HbA<sub>2</sub>, si hanno comportamenti sovrapponibili (49). La standardizzazione dell'HbA<sub>2</sub> porterà prossimamente a valori ancor più allineati tra metodi e sistemi diversi (50,51). A questi sistemi viene richiesta sensibilità, riproducibilità e precisione e ciò risulta comprensibile se si considera che una differenza minima di 0,5% può orientare verso conclusioni

significativamente diverse con decisioni cliniche e conseguenze importanti (52,53).

**Emoglobina fetale.** La quantificazione dell'emoglobina fetale (HbF) merita un discorso a parte. Tipica dell'epoca fetale e neonatale, l'HbF nell'adulto può avere numerosi significati che tuttavia non sono mai correlati con la semplice condizione di beta talassemia allo stato eterozigote. Si conoscono numerose situazioni che possono essere associate alla presenza "non normale" di HbF: uno switch incompleto o rallentato (dopo sei-dieci mesi di vita), una riattivazione indotta dell'HbF, presenza di mutazioni o polimorfismi dei geni gamma, delezioni del "cluster" non-alfa, presenza di modificatori non globinici, in alcune condizioni ematologiche, in situazioni riconducibili all'effetto conseguente alla presenza di difetti omozigoti, presenza di mutazioni composte del "cluster" beta globinico (54,55). Nella determinazione dell'HbF può essere tollerata una variabilità maggiore rispetto all'HbA<sub>2</sub> in quanto differenze anche di 0,5-1,0% non inducono a interpretazioni erranee, tali da portare a decisioni cliniche contrastanti (56,57). In Tabella 2 sono riportate alcune situazioni che possono orientare nell'interpretazione del soggetto adulto asintomatico con HbF. I portatori eterozigoti delle forme classiche di  $\beta$ -talassemia, di solito, possono essere diagnosticati sulla base dei risultati degli esami di primo livello così come previsto da diverse linee guida e raccomandazioni (9,40,52). Altre considerazioni su tale diagnostica, gli ambiti nella quale questa si sviluppa nella realtà italiana, la prevenzione in età adulta e alla nascita sono state illustrate in precedenti rassegne e raccomandazioni dedicate (58-60).

**Tabella 2**

Valori indicativi di HbF e del Volume Globulare Medio (MCV) in alcune delle condizioni più frequenti nel soggetto adulto asintomatico.

HbF (%)	MCV (fL)	Condizioni
<1,0	>78	Normalità
1,1 – 5,0	>78	Gravidanza, Polimorfismi dei geni Gamma, Variazioni di geni non globinici, alcune HPFH da difetto puntiforme
	>78	Hb Lepore, DeltaBeta-Talassemie, Beta-Talassemie con polimorfismi geni Gamma, Polimorfismi dei geni Gamma o HPFH con Alfa-Talassemie o con carenza marziale
5,1 – 20,0	>78	HPFH da difetto puntiforme, Altre cause non genetiche di aumento dell'HbF
	<78	DeltaBeta-Talassemie, Hb Lepore + HPFH da mutazione puntiforme, Beta-Talassemie + HPFH da mutazione puntiforme, Alcune HPFH da delezione
>20,0	>78	HPFH da delezione
	<78	DeltaBeta-Talassemie + polimorfismi dei geni Gamma o con alcune HPFH da mutazione puntiforme, Altre rare HPFH da delezione

HPFH, persistenza ereditaria di emoglobina fetale

### *Gli esami di secondo livello*

**Lo screening molecolare.** Come già accennato, le conclusioni derivate dagli esami di primo livello, soprattutto quando gli esami sono finalizzati alla ricerca di una condizione  $\beta$ -talassemica, possono richiedere conferme e caratterizzazioni mediante approcci successivi con l'analisi del DNA. La diagnostica molecolare si esegue di solito in laboratori e strutture di riferimento utilizzando varie tecnologie in continua evoluzione (61)<sup>3</sup> e adatte alla caratterizzazione completa dei geni globinici nel soggetto adulto, nel periodo fetale o alla nascita (9,62). Vi sono realtà nelle quali si esegue uno screening molecolare con metodi che consentono di rilevare la presenza solo dei difetti più frequenti e caratteristici di particolari aree geografiche; È questo il caso dei kit commerciali basati sull'ibridazione in due fasi che utilizzano un pannello di primer per le mutazioni comuni della talassemia ( $\alpha$  e  $\beta$ ) denominato "reverse dot-blotting" (RDB) (63). Con questo metodo, in alcuni casi, c'è il rischio di allungare i tempi e i costi della diagnosi, ma soprattutto è importante, che il referto venga integrato con un commento che chiarisca che si tratta di risultati ottenuti con un approccio analitico mirato ad un numero limitato di mutazioni e quindi non esaustivo. Il RDB può essere invece convenientemente utilizzato come test di conferma (64).

**L'analisi molecolare.** In Tabella 3 sono riportate le situazioni che più frequentemente portano a richieste appropriate di esami di secondo livello, mentre in Tabella 4 sono riportati i principali metodi oggi utilizzati per l'analisi del DNA, comprese due tecnologie emergenti nell'ambito dello studio dei geni globinici: "array comparative genomic hybridization" (a-CGH) e "next generation sequencing" (NGS). L'a-CGH trova applicazione da anni nel laboratorio di citogenetica per svelare la presenza di delezioni o duplicazioni in geni o regioni genomiche superando i limiti dell'indagine cromosomica in microscopia o mediante "fluorescence in situ hybridization" (FISH) (65). Più recentemente,

mediante l'a-CGH si sono ottenuti notevoli vantaggi anche per la ricerca di riarrangiamenti nei cluster dei geni globinici presentando una maggiore risoluzione anche rispetto alla "multiplex ligation probe amplification" (MLPA) con una caratterizzazione più precisa dei "breakpoint" (66-72). La tecnologia NGS, applicata inizialmente a studi in ambito oncologico, ha trovato utilizzi nell'analisi di molti geni e si sta affermando anche per quelli globinici e per altri ad essi correlati (73-80), apportando cambiamenti radicali rispetto al metodo di sequenziamento tradizionale descritto da Sanger (81). L'NGS è in grado di analizzare sequenze di geni diversi in una singola sessione analitica con un rapporto costo/risultato sempre più favorevole. È infatti in grado di rilevare piccoli cambiamenti nella sequenza del DNA mediante cicli ripetuti di estensioni nucleotidiche ad opera di una DNA-polimerasi o, in alternativa, mediante cicli iterativi di ligazione di oligonucleotidi. Pannelli mirati di geni associati a fenotipi specifici hanno consentito inizialmente di fare un salto di qualità nelle indagini genetiche. Oggi maggiori possibilità e risultati diagnostici si ottengono esaminando la sequenza dell'intero esoma, "whole-exome sequencing" (WES). Questo approccio prende in esame gli esoni e le sequenze introniche adiacenti evidenziando eventuali difetti di "splicing" e rappresenta un valido supporto diagnostico che si sta diffondendo a beneficio di pazienti con fenotipi complessi. Il sequenziamento dell'intero genoma o "whole-genome sequencing" (WGS), che studia i geni nella loro globalità, può costituire il metodo diagnostico definitivo, essendo in grado di esaminare interamente i geni, comprese le regioni introniche, quelle regolatrici ed eventuali ri-arrangiamenti genomici. Tuttavia, rappresenta una procedura più sofisticata e costosa quando applicata ad una diagnostica routinaria e può porre ad oggi ulteriori problemi interpretativi (82). La procedura NGS consente in ogni caso di ottenere una quantità di informazioni contemporaneamente su molti geni in minor tempo rispetto al passato. Tuttavia, la grande mole di informazioni e di dati genetici che

#### **Tabella 3**

*Alcune condizioni nelle quali è appropriato l'esame molecolare dei geni globinici*

- In presenza di HbA<sub>2</sub> >3,2% con MCV normale o <80 fL
- In presenza di HbF >2,0% con e senza microcitosi
- Quando si sospetta la presenza di alfa talassemia
- Quando si sospetta la presenza di un composto o l'associazione di più difetti
- In presenza di varianti Hb visibili in HPLC o CE
- Inquadramento molecolare di soggetti TDT e NTDT
- In soggetti politrasfusi non precedentemente caratterizzati
- In presenza di una anamnesi con segni clinici e indicatori ematologici significativi per emoglobinopatie
- In previsione di una diagnosi prenatale
- Nella diagnosi fetale
- Per conferme o diagnosi alla nascita
- Nello studio familiare per consentire consulenze genetiche appropriate

*HPLC, Cromatografia Liquida ad Alta Risoluzione; CE, Elettroforesi capillare; TDT, Talassemia Trasfusione Dipendente; NTDT, Talassemia Non Trasfusione Dipendente*

<sup>3</sup>Definizioni accurate delle tecniche di biologia molecolare sono elencate nel Glossario recentemente pubblicato (61)

**Tabella 4**

Principali metodologie utilizzate per l'individuazione, la diagnosi presuntiva e la caratterizzazione delle emoglobinopatie

PRIMO LIVELLO	Talassemie $\beta$		Talassemie $\alpha$		HPFH		Varianti $\alpha, \beta, \gamma, \delta$	HbS	Talassemia $\delta$	$\delta\beta$ Talassemia e Hb Lepore
	Non-Delezioni	Delezioni	Non-Delezioni	Delezioni	Non-Delezioni	Delezioni				
HPLC/CE e Emocromo	X	X	X	X	X	X	X <sup>(a)</sup>	X	X	X
Ferro	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X
Test di sickling	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
Test instabilità / p50	-	-	-	-	-	-	-	X <sup>(b)</sup>	-	-
<b>SECONDO LIVELLO - Analisi DNA</b>										
Gap-PCR	-	X	-	X	-	X	-	-	-	X
MLPA <sup>(c)</sup>	-	X	-	X	-	X	-	-	-	X
RDB <sup>(d)</sup>	X	-	X	-	-	-	X <sup>(e)</sup>	X <sup>(f)</sup>	-	-
Sequenziamento	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-
aCGH <sup>(g)</sup>	-	X	-	X	-	X	-	-	-	X
NGS <sup>(h)</sup>	X	-	X	-	X	-	X	-	-	-
<b>SECONDO LIVELLO - Spettrometria di massa DNA</b>	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-

(a) molte varianti non sono visibili in HPLC o CE e l'emocromo non è significativamente alterato;

(b) per le  $\delta$  varianti questi esami non vengono eseguiti in quanto non significativi;

(c) multiplex ligation probe amplification;

(d) reverse dot-blotting;

(e) di solito nei kit commerciali le varianti considerate sono quelle più frequenti;

(f) la conferma in RDB può essere utilizzata quando non si effettua il test di sickling;

(g) array comparative genomic hybridization;

(h) next generation sequencing

HPFH, persistenza ereditaria di emoglobina fetale; HPLC, Cromatografia Liquida ad Alta Risoluzione; CE, Elettroforesi capillare; p50, misura della pressione parziale dell'ossigeno al 50% di saturazione; MLPA, Multiplex ligation probe amplification; RDB, Reverse dot-blotting; ACGH, Array comparative genomic hybridization; NGS, Next generation sequencing.

viene messa a disposizione potrebbe porre dei limiti al momento della lettura e dell'interpretazione dei risultati, se non si utilizzano gli strumenti bioinformatici di previsione computazionale oggi disponibili, che sono sempre più efficienti (82-85). La correlazione con il fenotipo del soggetto esaminato, la validazione e gestione dei risultati, le problematiche etiche nell'utilizzo delle informazioni ottenute, nonché l'implementazione dei controlli di qualità (86) sono alcuni degli aspetti che dovranno essere considerati e trattati da linee-guida dedicate alle emoglobinopatie, ad integrazione di quelle esistenti.

## Le Alfa Talassemie

L' $\alpha$ -talassemia, nelle diverse forme ed espressioni, rappresenta una delle più frequenti variazioni genetiche presenti nell'uomo. Nelle zone tropicali e subtropicali dove è prevalente e in quelle del Nord Europa e del Mediterraneo interessate dalle immigrazioni degli ultimi decenni, l' $\alpha$ -talassemia risulta sottostimata soprattutto nei casi di microcitosi senza anemia o clinicamente asintomatici e in associazione con altri difetti globinici (87-89). Anche per l' $\alpha$ -talassemia, l'elevata prevalenza è stata messa in relazione al vantaggio selettivo nei

confronti della malaria (90,91). L'  $\alpha$ -talassemia è associata a espressioni fenotipiche variabili in relazione al numero di geni assenti o non funzionanti sui quattro presenti (denominati  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  su ciascun allele). I difetti noti sono almeno 130 (15) per la maggior parte di tipo delezionale e si differenziano per il numero variabile di basi assenti nel "cluster"  $\alpha$ . A questi si devono aggiungere almeno altre 40 varianti  $\alpha$  che presentano comportamenti talassemici rilevabili soprattutto quando si associano in composti eterozigoti con le forme classiche di  $\alpha$ -talassemia (89,92). Queste varianti talassemiche, prodotte prevalentemente da difetti puntiformi del gene  $\alpha 2$ , esprimono comportamenti più marcati in senso talassemico rispetto alle varianti talassemiche del gene  $\alpha 1$ ; ciò sembra in relazione al livello di trascrizione dei due geni  $\alpha 2$  e  $\alpha 1$  e quindi alla capacità di sintetizzare la variante (93,94). Il neonato che presenta uno o più difetti  $\alpha$ -talassemici produce un ridotto numero di catene  $\alpha$  rispetto alle catene eterologhe  $\gamma$  normalmente sintetizzate, che risulteranno quindi in eccesso con formazione di tetrameri  $\gamma 4$  (Hb Bart's) in quantità variabilmente crescente in rapporto al minor numero di geni  $\alpha$  non funzionanti. Allo stesso modo, nell'adulto le catene  $\beta$  in eccesso saranno in grado di formare tetrameri  $\beta 4$  (HbH), ma tale tetramero potrà essere rilevato quando risultano non funzionanti tre geni  $\alpha$  su quattro. L'Hb Bart's e l'HbH sono prodotti instabili ma comunque significativamente più stabili degli aggregati di  $\alpha$ -globina in eccesso che sono invece causa di emolisi intramidollare nella  $\beta$ -talassemia omozigote o in presenza di composti  $\beta$ -talassemici. Tuttavia, con l' $\alpha$ -talassemia si producono precipitati all'interno degli eritrociti (inclusioni) che aumentano con l'invecchiamento del globulo rosso, e che sono in relazione con una clearance prematura da parte del sistema reticoloendoteliale e quindi causano una ridotta sopravvivenza eritrocitaria (95,96). In epoca pre-molecolare, nel neonato si faceva riferimento alla quantità di Hb Bart's per risalire al difetto  $\alpha$ -talassemico presente. Tale criterio oggi può essere preso in considerazione solo per una diagnosi presuntiva (97). Nell'adulto, un esame datato ma ancora utile per confermare la presenza di HbH è quello che consente di osservare tipiche inclusioni eritrocitarie, dopo incubazione del sangue prelevato in EDTA per almeno 1 ora a 37°C con Brilliant Cresyl Blue (BCB) (98). Questo esame risulta tutt'ora indicato anche per documentare la presenza di varianti instabili (99). La quantità di HbH rilevabile con i metodi separativi maggiormente in uso (49,100) può essere molto variabile e ciò può dipendere senz'altro dall'instabilità del tetramero  $\beta 4$ , a cui si è già fatto cenno (96), ma anche dalla tipologia dei difetti molecolari che contribuiscono a produrre la condizione di HbH disease (101-104).

#### *Gli esami di primo livello.*

*L'HbA<sub>2</sub> e i parametri eritrocitari.* Dal punto di vista

ematologico o emoglobinico non vi è un parametro significativo che può consentire, mediante screening di base nelle forme classiche di  $\alpha$ -talassemia, una diagnosi certa, come accade con l'HbA<sub>2</sub> per la  $\beta$ -talassemia. Il percorso obbligato è sempre quello di eseguire gli esami di primo livello che in prima istanza mirano, come già detto, alla prevenzione della  $\beta$ -talassemia, ma che nel caso di sospetto di  $\alpha$ -talassemia mostrano HbA<sub>2</sub> nella norma o lievemente diminuita, assenza di HbF, valori di MCV ed MCH variabilmente diminuiti e la necessità di procedere alla valutazione dell'assetto marziale. Nel sospetto di  $\alpha$ -talassemia vi è quindi sempre la necessità di proseguire le indagini di laboratorio con diagnostiche differenziali, in primo luogo rispetto alla carenza marziale e, quando ritenuto opportuno, alla conferma con la caratterizzazione molecolare (9,46). La Tabella 5 riporta gli intervalli di variabilità di alcuni indicatori ematologici ed emoglobinici ricavati dalla letteratura (9,60,92,105,106) e relativi a diverse condizioni  $\alpha$ -talassemiche messe a confronto con la condizione di normalità e di carenza marziale. Per una diagnosi certa e la caratterizzazione delle  $\alpha$ -talassemie occorre quindi procedere all'analisi molecolare dei geni globinici.

#### *Gli esami di secondo livello.*

*L'analisi molecolare.* Anche in questo caso nelle realtà organizzative dei laboratori possono esistere approcci diversi comprendenti un livello molecolare di screening per le più comuni delezioni: le due talassemie  $\alpha+$  (-3.7 e -4.2) e le cinque talassemie  $\alpha^0$  (-20,5; --MED; --SEA; --FIL; --THAI) mediante Gap-PCR (PCR specifica per delezioni). Tale tecnica si basa sull'utilizzo di primer specifici che in caso di delezione non sono in grado di generare un prodotto PCR (105). Per confermare o caratterizzare altri possibili difetti delezionali si utilizza l'MLPA o l'array CGH. La ricerca di difetti puntiformi o di piccole delezioni si esegue mediante sequenziamento con tecnica Sanger tradizionale o in prospettiva, mediante NGS (62). È opportuno che il sequenziamento consideri separatamente i geni  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  per una localizzazione opportuna dei difetti e una corretta valutazione degli effetti che possono produrre, alla luce di quanto precedentemente riportato. Tale approccio diagnostico molecolare è riassunto in Tabella 4.

#### **HbS ed altre varianti dell'emoglobina**

I difetti quantitativi o strutturali emoglobinici costituiscono un capitolo altrettanto importante delle emoglobinopatie e rappresentano circa il 75% degli oltre 1800 difetti ad oggi noti. Il 94% delle varianti emoglobiniche risultano dipendenti da mutazioni puntiformi dei geni globinici e comportano, nella maggior parte dei casi, la sostituzione di un amminoacido in una delle catene  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  o  $\gamma$ , con effetti quantitativi e qualitativi molto eterogenei (15,6). Le caratteristiche delle varianti dipendono dal tipo di catena mutata, dall'amminoacido

Tabella 5

Valori di alcuni parametri ematologici ed emoglobinici riscontrabili in presenza di forme diverse di alfa talassemia, di carenza marziale e nella normalità nel soggetto adulto e alla nascita

Geni alfa coinvolti	Fenotipo	Soggetto adulto					Alla nascita <sup>(a)</sup>	
		Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA <sub>2</sub> (%)	HbH (%)	Hb Bart's (%)	HbA (%)
$\alpha / \alpha\alpha$	$\alpha^*$ eterozigote	110 - 150	77,0 - 82,0	23,0 - 28,0	2,2 - 3,0	-	<2,0	<30,0
$\alpha^{ND(b)} / \alpha\alpha$	$\alpha^*$ eterozigote	110 - 150	70,0 - 78,0	23,0 - 26,0	2,0 - 3,0	-	<4,0	<28,0
$-\alpha / -\alpha$	$\alpha^*$ omozigote	110 - 150	65,0 - 75,0	21,0 - 24,0	2,0 - 2,8	-	<8,0	<25,0
$-- / \alpha\alpha$	$\alpha^*$ eterozigote	110 - 150	64,0 - 74,0	20,0 - 23,0	2,0 - 2,8	-	<8,0	<25,0
$\alpha^{ND} / -\alpha$	composto eterozigote $\alpha^*$	100 - 130	65,0 - 70,0	19,0 - 22,0	1,6 - 3,0	-	<8,0	<25,0
$\alpha^{ND} / \alpha^{ND}$	$\alpha^*$ omozigote	80 - 110	58,0 - 65,0	17,0 - 20,0	<2,5	<4,0	<10,0	<25,0
$-\alpha / --$	HbH disease	70 - 110	57,0 - 70,0	16,0 - 23,0	1,0 - 2,2	2,0 - 25,0	<30,0	<20,0
$\alpha^{ND} / --$	HbH disease	70 - 110	60,0 - 72,0	17,0 - 20,0	0,9 - 2,0	<30,0	<35,0	<20,0
$-- / --$	Idrope fetale	-	-	-	-	? <sup>(c)</sup>	>70,0	-
<b>Carenza marziale</b>	Anemia	60 - 110	58,0 - 75,0	16,0 - 24,0	1,4 - 3,0	-	-	-
$\alpha\alpha / \alpha\alpha$	Normalità	130 - 160	89,0 - 95,0	28,0 - 32,0	2,4 - 3,2	-	<0,5	14,0 - 35,0

(a) i valori di HbA (HbF) e Hb Bart's riscontrabili alla nascita sono condizionati da numerosi fattori di variabilità (59);

(b)  $\alpha^{ND}$ : difetto alfa da Non-Delezione;

(c) possibile presenza di HbH ed emoglobine embrionali in quantità variabile e non ipotizzabile;

sostituente o sostituito, dalla posizione della sostituzione, dai contatti con l'eme, dai legami con l'ossigeno e dalla capacità che hanno le catene mutate di costituire legami utili alla formazione del tetramero globinico (108). In Tabella 6 sono riportate le percentuali relative di alcune varianti (15,106,109) mentre la Tabella 7 include una classificazione essenziale delle varianti emoglobiniche associate a fenotipi clinici significativi nonché il ruolo del laboratorio nella loro individuazione. Le quattro varianti HbS (HBB:c.20A>T), HbE, (HBB:c.79G>A), HbC (HBB:c.19G>A), HbD-Punjab (Los Angeles) (HBB:c.364G>C), sono di gran lunga le più diffuse al mondo e interessano oltre il 90% dei soggetti portatori di varianti. Tutti gli altri difetti strutturali si possono quindi considerare rari o molto rari. L'HbS è certamente la variante più diffusa e studiata e come detto, produce la condizione definita SCD quando si presenta allo stato omozigote o in composti eterozigoti con una delle tre varianti HbD-Punjab, HbC, HbE, con

alcune altre rare varianti o con la beta talassemia. La figura 2 mostra la gamma dei valori di HbS osservati in oltre 400 soggetti esaminati in HPLC, con lo stesso strumento, nel corso di un decennio da uno di noi (GI). Tali soggetti sono stati suddivisi in gruppi in funzione dell'assenza o presenza, accertata mediante analisi molecolare, di difetti alfa e beta talassemici. Inoltre, è stata confermata la concordanza dei valori di HbS nei vari gruppi con quelli riportati in letteratura in analoghe situazioni (106,128).

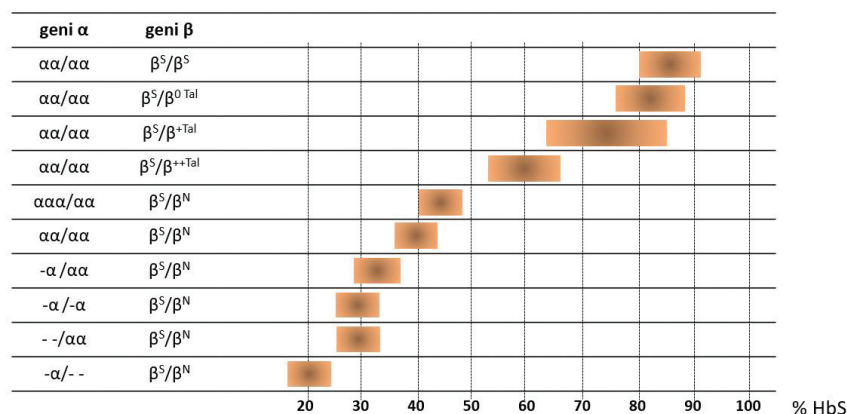
L'HbS è stata descritta anche in diversi composti con altre varianti beta e associata a talassemie e varianti alfa senza produrre significative alterazioni del fenotipo clinico (129,130). È evidente quindi l'importanza di una corretta diagnosi; discriminare le diverse combinazioni significa prevedere i diversi possibili fenotipi nel soggetto adulto, così come alla nascita quando può essere necessario procedere precocemente a profilassi e prevenzione infettiva (129).

**Tabella 6**

Varianti Emoglobiniche suddivise in gruppi sulla base della loro percentuale relativa

Variante Hb (%)	Varianti o composti in diverse condizioni
< 2,0	Delta-varianti, HbA <sub>2</sub> anomale dovute alla presenza di Alfa-varianti
2 – 5	Hb Lepore, Delta-varianti in presenza di Beta-Talassemia, Rare varianti instabili
5 – 15	Hb Lepore, Alfa-varianti, Alfa-varianti con Beta-Talassemie
15 – 24	Alfa-varianti, Beta-varianti con Alfa-Talassemia, Beta-varianti instabili
24 – 45	Beta-varianti, Alfa-varianti con Alfa-Talassemia, Alfa-Varianti omozigoti Alfa-varianti con Alfa-Talassemia <sup>(a)</sup>
45 – 50	Beta-varianti (eterozigoti), Alfa-varianti con Alfa-Talassemia <sup>(a)</sup> , Beta-varianti + Triplicazione geni Alfa, Alcune Beta-varianti eterozigoti con catene Beta iper-affini alle catene Alfa
50 – 55	Rare Beta-varianti eterozigoti con catene Beta iper-affini alle catene Alfa, Alfa-varianti con Alfa-Talassemia <sup>(a)</sup>
55 – 70	Beta-varianti + Beta <sup>++</sup> Talassemia, Beta-varianti + Beta <sup>+</sup> Talassemia Alfa-varianti con Alfa-Talassemia <sup>(a)</sup>
70 – 95	Beta-varianti + Beta <sup>+</sup> Talassemia, Beta-varianti + Beta <sup>0</sup> , Beta-varianti omozigoti, Beta-varianti + HPFH da delezione, Alfa-varianti con Alfa-Talassemia <sup>(a)</sup>

(a) La % relativa dell'Alfa-variante dipende dal numero di geni alfa non funzionanti

**Figura 2**

Valori percentuali diversi di HbS che formano intervalli di ampiezza diversa riscontrati in alcuni composti con Beta Talassemie o in associazione con Alfa Talassemie.

### Gli esami di primo livello.

L'assetto emoglobinico e i parametri eritrocitari in laboratorio, all'interno del percorso di primo livello per la β-talassemia, è in grado di osservare e quantificare in CE o in HPLC le varianti prevalenti e confermarle mediante l'uso combinato dei due metodi separativi e con esami specifici, quando previsti. Volendo infatti utilizzare al massimo le potenzialità della cromatografia e dell'elettroforesi sarebbe auspicabile, in alcuni casi,

l'utilizzo di entrambe le metodiche separative riducendo il ricorso a più onerose conferme diagnostiche. Per le varianti emoglobiniche, gli indici eritrocitari hanno un ruolo minore, tuttavia la concentrazione dell'emoglobina e l'ematokrito (HCT) potranno essere utili nella valutazione delle varianti instabili e/o con affinità alterata per l'ossigeno.

L'utilizzo di metodi automatizzati separativi dedicati nella ricerca dei difetti globinici ha portato alla scoperta

Tabella 7

Classificazione delle varianti clinicamente rilevanti e caratteristiche osservate in laboratorio

Gruppo	Effetto	Conseguenza ematologica e clinica	Esame specifico di primo livello <sup>(a)</sup>	Possibile variante Hb	Riferimento
<b>Proprietà fisico/chimiche alterate</b>	Polimerizzazione	Falcizzazione, Sindromi falcemiche	Test di falcizzazione Separazione (CE o HPLC)	HbS	110-113
<b>Proprietà fisico/chimiche alterate</b>	Cristallizzazione	Microcitosi e anemia emolitica	Separazione (CE o HPLC) Morfologia emazie	HbC	110-113
<b>Varianti instabili</b>	Minor sopravvivenza eritrocitaria	Anemia emolitica	Test di instabilità Test al BCB	Hb Genova ( $\beta$ -var) Hb Torino ( $\alpha$ -var)	114 115
<b>Varianti con aumentata Affinità O<sub>2</sub></b>	Aumento dell'ematokrito	Eritrocitosi	p50 Separazione (CE o HPLC) <sup>(b)</sup>	Hb San Diego ( $\beta$ -var) Hb J-Capetown ( $\alpha$ -var)	116 117
<b>Varianti talassemiche puntiformi: sostituzioni, delezioni o inserzioni</b>	Talassemia	Microcitosi	Separazione (CE o HPLC) <sup>(b)</sup>	Hb Milano ( $\alpha$ -var) Hb Monroe ( $\beta$ -var)	120 121
<b>Varianti talassemiche da fusione</b>	Talassemia	Microcitosi Sindrome talassemica	Separazione (CE o HPLC) <sup>(b)</sup>	Hb Lepore	122
<b>Varianti da splicing anomalo</b>	Talassemia	Microcitosi Sindrome talassemica	Separazione (CE o HPLC) <sup>(b)</sup>	HbE	123
<b>Varianti iper-instabili</b>	Talassemia	Microcitosi e talassemia	Separazione (CE o HPLC) <sup>(b)</sup>	Hb Cagliari ( $\beta$ -var) Hb Quong Sze ( $\alpha$ -var)	124 125
<b>Varianti con allungamento della catena</b>	Instabilità e/o talassemia	Microcitosi, anemia, talassemia	Separazione (CE o HPLC) <sup>(b)</sup>	Hb Constant Spring ( $\alpha$ -var) Hb Trento ( $\beta$ -var)	126 127

(a) principale o unico esame utile a confermare o ipotizzare la presenza di un difetto emoglobinico;

(b) non sempre risulta informativo

BCB, Brilliant Cresyl Blue, HPLC, Cromatografia Liquida ad Alta Risoluzione; CE, Elettroforesi capillare; p50, misura della pressione parziale dell'ossigeno al 50% di saturazione;

Tabella 8

Alcune considerazioni generali utili nella diagnosi di laboratorio delle varianti emoglobiniche

- Le varianti sovente si riscontrano casualmente in soggetti asintomatici, nel corso di esami preventivi per la beta talassemia o di diagnosi/monitoraggio del diabete
- L'utilizzo di sistemi separativi per la diagnosi e il monitoraggio dell'HbA1c ha contribuito in anni recenti al riscontro di soggetti asintomatici, o comunque non informati, portatori di difetti qualitativi o quantitativi dell'emoglobina
- I classici parametri ematologici utili per la diagnosi di beta talassemia raramente risultano alterati in presenza di varianti
- La rilevazione delle varianti è parzialmente metodo-dipendente
- Oltre la metà dei difetti qualitativi (varianti) che si potrebbero produrre nei geni globinici non vengono evidenziati dai sistemi separativi maggiormente in uso
- L'anamnesi e le informazioni pre-test possono essere importanti per supporre un difetto strutturale non evidenziabile con i metodi separativi
- La percentuale relativa di una variante dà indicazioni sulla catena coinvolta, sulle possibili interazioni con difetti talassemici, sulla presenza di composti o associazioni
- È necessaria la conferma della presenza delle varianti con i metodi indicati dalle linee guida
- La caratterizzazione molecolare è sempre necessaria (anche quando con metodi biochimici di secondo livello viene individuata la sostituzione amminoacidica)
- Gli esami funzionali in vitro orientano verso le possibili conseguenze in vivo e contribuiscono a fornire utili indicazioni sui fenotipi accertati o attesi

casuale di numerose varianti riportate nel database di Hbvar (15). La casualità dell'osservazione di una variante, in molti casi, dipende dalla assenza di fenotipi ematologici o clinici alterati. Tuttavia, la presenza di una variante può condizionare una corretta diagnosi di talassemia quando interferisce con la determinazione dell'HbA2 (6,132), o impedire la diagnosi e il monitoraggio della condizione diabetica, interferendo con l'HbA1c (133,134). Talvolta invece i difetti strutturali dell'emoglobina sono causa di presentazioni cliniche insolite che possono richiedere indagini anche complesse (110,135). Non sempre gli esami specifici utili a documentare la funzionalità dell'emoglobina in presenza di un difetto strutturale (falcizzazione, instabilità, ricerca di inclusioni eritrocitarie, ricerca di metaemoglobina, e la valutazione della affinità per l'ossigeno mediante determinazione del parametro p50 che misura la pressione parziale dell'ossigeno al 50% di saturazione dei relativi siti di legame) vengono presi in considerazione o comunque sono disponibili nei laboratori, inducendo così a conclusioni dubbie o errate.

#### *Gli esami di secondo livello*

*L'analisi molecolare.* Lo studio delle varianti contribuisce ancora oggi a migliorare la conoscenza delle funzioni dell'emoglobina; pertanto, in presenza di una variante osservabile o ipotizzabile, l'analisi molecolare è quasi sempre necessaria, così come indicato in Tabella 3. In Tabella 4 sono riportati i metodi utilizzabili per la caratterizzazione dei difetti strutturali, consentendo anche la definizione o l'esclusione di eventuali difetti quantitativi co-ereditati. Le conclusioni genetiche devono essere sempre integrate e correlate da quelle ematologiche e funzionali.

Può essere utile menzionare il contributo che la spettrometria di massa offre. È questa certamente una tecnica non nuova ma che si è evoluta nel tempo e nella sua complessità può svolgere comunque un ruolo complementare nei percorsi di caratterizzazione delle emoglobinopatie, in particolare nel definire la composizione amminoacidica delle modificazioni post-traduzionali dell'emoglobina e nei rari casi di mosaicismo (136-140).

La Tabella 8 riporta in sintesi alcune considerazioni generali utili alla diagnosi e alla interpretazione dei risultati di laboratorio in presenza di varianti emoglobiniche. Tali considerazioni possono contribuire ad elaborare adeguati commenti integrativi al referto degli esami di primo livello, e alle conclusioni definitive, o presuntive, per orientare eventuali indagini di secondo livello e consentire adeguate consulenze dedicate.

## CONCLUSIONI

Per lo studio e la diagnostica delle emoglobinopatie sono attesi ulteriori miglioramenti futuri relativamente ai metodi per gli esami di base ma soprattutto per le indagini molecolari. In particolare, l'NGS potrà essere disponibile, per i difetti dell'emoglobina, in un numero

crescente di laboratori anche in combinazione con altri metodi per i difetti puntiformi e delezionali (141). Sarà così reso possibile il sequenziamento simultaneo dei geni globinici, dei numerosi geni che codificano fattori di trascrizione candidati a modificare l'espressione clinica nei pazienti con difetti dell'emoglobina (63,80,91,142, 143) e dei geni che possono giocare un ruolo nelle risposte alle terapie farmacologiche (144,145).

In una realtà segnata da una crescente complessità, dalla riconfermata importanza degli esami preliminari non molecolari e ad una maggiore comprensione delle basi genetiche dei difetti, il laboratorio del futuro dovrà essere sempre più consapevole del proprio ruolo. Tutto ciò in un contesto che vede notevoli progressi nel mondo della clinica, che si avvale anche delle conclusioni diagnostiche del laboratorio per rispondere in modo appropriato alle richieste di consulenza e gestire con terapie adeguate e personalizzate i pazienti affetti da emoglobinopatie (12,146,147).

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cyrklaff, M, Sanchez, C.P., Kilian, N. et al. Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Science* 2011;334:1283-86.
2. Luzzatto L. Sick cell anaemia and malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4:e2012065.
3. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* 2010;115:4331-6.
4. Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health* 2014;2:e80-e89.
5. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet* 2013;381:142-51.
6. Barberio G, Ivaldi G. Varianti osservate in elettroforesi o cromatografia e loro interferenza con le componenti normali dell'emoglobina. In: *Emoglobinopatie dalla diagnosi alle consulenze specialistiche*. Padova:Piccin ed, 2020:62-4.
7. Henderson S, Timbs A, McCarthy J, et al. Incidence of haemoglobinopathies in various populations – the impact of immigration. *Clin. Biochem* 2009;42:1745–56.
8. Angastiniotis M, Vives Corrons JL, Soteriades ES, et al. The impact of migrations on the health services for rare diseases in Europe: the example of haemoglobin disorders. *ScientificWorldJournal* 2013:727905.
9. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2015;23:426-37.
10. Ivaldi G, Barberio G, Carta M, et al. Diagnosi di laboratorio e prevenzione delle emoglobinopatie: considerazioni e proposte sulla comunicazione del risultato degli esami di primo livello. *Biochim Clin* 2010;34:277-82.
11. Plebani M. *Medicina personalizzata e Laboratorio Clinico*:

- osare con cura. *Biochim Clin* 2016;40:33-9.
12. Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Red cells in post-genomic era: impact of personalized medicine in the treatment of anemias. *Haematologica* 2015;100:3-6.
  13. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2005;353:1135-46.
  14. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. 4th ed. Oxford (UK): Blackwell Science, 2001.
  15. HbVar:database for human hemoglobin variants and thalassemia mutations. <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html> bx.psu.edu (ultimo accesso 20.07.2020).
  16. Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, et al. Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica*. 2013;98:833-44.
  17. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. *Thalassaemia*. *Lancet* 2018;391:155-67.
  18. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, et al. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT). 3rd ed. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2014.
  19. Taher A, Musallam K, Cappellini MD et al. Guidelines for the management of non transfusion dependent thalassaemia (NTDT). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24672826/> (ultimo accesso: luglio 2020)
  20. Taher AT, Cappellini MD. How I manage medical complications of beta-thalassemia in adults. *Blood* 2018;132:1781-91.
  21. Taher AT, Origa R, Perrotta S, et al. New film-coated tablet formulation of deferasirox is well tolerated in patients with thalassemia or lower-risk MDS: Results of the randomized, phase II ECLIPSE study. *Am J Hematol* 2017;92:420-8.
  22. Ekwattanakit S, Siritanaratkul N, Viprakasit V. A prospective analysis for prevalence of complications in Thai nontransfusion-dependent Hb E/ $\beta$ -thalassemia and  $\alpha$ -thalassemia (Hb H disease). *Am J Hematol*. 2018;93:623-9.
  23. Higgs DR. The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011718.
  24. Baronciani D, Angelucci E, Potschger U, et al. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000-2010. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:536-41.
  25. Motta I, Bou-Fakhredin R, Taher AT, et al. beta thalassaemia: new therapeutic options beyond transfusion and iron chelation. *Drugs* 2020;80:1053-63.
  26. motta i, ghiaccio v, cosentino a, et al. curing hemoglobinopathies: challenges and advances of conventional and new gene therapy approaches. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2019;11:e2019067.
  27. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. gene therapy in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* 2018;378:1479-93.
  28. Salvatore F, Nunziato M. Il premio Nobel 2020 per la chimica: dal "gene editing" al "gene drive". *Biochimic Clin* 2020;44:327-9.
  29. Demirci S, Leonard A, Tisdale JF. Genome editing strategies for fetal hemoglobin induction in beta-hemoglobinopathies. *Hum Mol Genet* 2020;29(R1):R100-R106.
  30. Shah S, Sheth R, Shah K, et al. Safety and effectiveness of thalidomide and hydroxyurea combination in  $\beta$ -thalassaemia intermedia and major: a retrospective pilot study. *Br J Haematol* 2020;188:e18-e21.
  31. Taher AT, Karakas Z, Cassinero E, et al. Efficacy and safety of ruxolitinib in regularly transfused patients with thalassemia: results from a phase 2a study. *Blood* 2018;131:263-5.
  32. Cappellini MD, Viprakasit V, Taher AT, et al. A phase 3 trial of luspatercept in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -Thalassemia. *J Med* 2020;382:1219-31.
  33. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18010.
  34. Tisdale JF, Thein SL, Eaton WA. Treating sickle cell anemia. *Science*. 2020;367:1198-9.
  35. Russo G, De Franceschi L, Colombatti R, et al. Current challenges in the management of patients with sickle cell disease - A report of the Italian experience. *Orphanet J Rare Dis* 2019;14:120.
  36. Ali MA, Ahmad A, Chaudry H, et al. Efficacy and safety of recently approved drugs for sickle cell disease: a review of clinical trials. *Exp Hematol* 2020 doi: 10.1016/j.exphem.2020.08.008.
  37. Matte A, Cappellini MD, Iolascon A, et al. Emerging drugs in randomized controlled trials for sickle cell disease: are we on the brink of a new era in research and treatment? *Expert Opin Investig Drugs* 2020;29:23-31.
  38. Roth IL, Lachover B, Koren G, et al. Detection of  $\beta$ -thalassaemia carriers by red cell parameters obtained from automatic counters using mathematical formulas. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2018 doi: 10.4084/MJHID.2018.008.
  39. Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R, et al. In: Old J, ed. *Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders*. 2nd ed. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation, 2013.
  40. Thein SL. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011700.
  41. Giambona A, Passarello C, Vinciguerra M, et al. Significance of borderline Hemoglobin A2 values in an Italian population with a high prevalence of  $\beta$ -Thalassemia. *Haematologica* 2008; 93:1380-4.
  42. Antony AC. Megaloblastic anemias. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ eds. *Hematology: Basic Principles and Practice*. New York: Churchill Livingstone, 2005:519-56.
  43. Rosatelli C, Falchi AM, Scalas MT, et al. Hematological phenotype of the double heterozygous state for alpha and beta thalassemia. *Hemoglobin* 1984;8:25-35.
  44. Rund D, Filon D, Strauss N. Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta-thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* 1992;79:238-43.
  45. Galanello R, Ruggeri R, Addis M, et al. Hemoglobin A2 in iron deficient beta thalassemia heterozygotes. *Hemoglobin* 1981;5:613-8.
  46. Raccomandazioni per la diagnostica di primo livello delle emoglobinopatie-SITE 2012 [http://www.site-italia.org/collana\\_scientifica.php](http://www.site-italia.org/collana_scientifica.php). (ultimo accesso: aprile 2019).
  47. Mosca A, Paleari R, Ivaldi G, et al. The role of Haemoglobin A2 testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol* 2009; 62:13-7.
  48. Ivaldi G, Barberio G, Hartevelde C, et al. HbA2 measurements in beta-thalassemia and in other conditions. *Thalassemia Rep* 2014; 4:45-8.
  49. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M, et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol* 2009; 31:484-95.
  50. Paleari R, Ceriotti F, Hartevelde CL, et al. Calibration by commutable control materials is able to reduce intermethod differences of current high-performance methods for HbA2. *Clin Chim Acta* 2018;477:60-5.
  51. Paleari R, Mosca A. Standardization of the HbA2 Assay. *EJIFCC* 2018;29:298-302.
  52. Stephens AD, Colah R, Fucharoen S, et al. ICSH recommendations for assessing automated high-

- performance liquid chromatography and capillary electrophoresis equipment for the quantitation of HbA2. *Int J Lab Hematol* 2015;37:577-82.
53. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010;149:35-49.
  54. Mosca A, Paleari R, Leone D, et al. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 2009;42:1797-801.
  55. Thein SL, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br J Haematol* 2009;145:455-67.
  56. Stephen AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin F. *Int J Lab Hematol* 2012;34:14-20.
  57. Sampietro M, Thein SL, Contreras M, et al. Variation of HbF and F-cell number with the G-gamma X<sub>mn</sub>I (C>T) polymorphism in normal individuals. *Blood* 1992;79:832-3.
  58. Barberio G, Ivaldi G. Le emoglobinopatie in Italia. Parte I: Nosologia clinica ed epidemiologia. *Biochim Clin* 2016;40:78-95.
  59. Barberio G, Ivaldi G. Le emoglobinopatie in Italia. Parte II: Prevenzione e diagnostica di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:96-107.
  60. Ivaldi G, Barberio G, Caruso V, et al. Raccomandazioni per la diagnosi neonatale delle emoglobinopatie. *Biochim Clin* 2015;39:116-34.
  61. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica Parte III: diagnostica molecolare. *Biochim Clin* 2020; 44:174-9.
  62. Old J, Hartevelde C. Carrier Screening for the Haemoglobinopathies: Past, Present and Future. *OBM Genetics* 2017;1:005.
  63. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark Med* 2014;8:119-31.
  64. Maggio A, Giambona A, Cai SP, et al. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 1993;81:239-42.
  65. Knight SJ, Horsley SW, Regan R et al. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 1997;5:1-8.
  66. Gallienne AE, Dreau HM, McCarthy J et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of 17 different beta-globin gene deletions (including four novel mutations) in the UK population. *Hemoglobin* 2009;33:406-16.
  67. Shalev H, Landau D, Pissard S, et al. A novel epsilon gamma delta beta thalassemia presenting with pregnancy complications and severe neonatal anemia. *Eur J Haematol* 2013;90:127-33.
  68. Philipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar, et al. Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for alpha- and beta-thalassemia rearrangements. *Hum Mutat* 2012;33:272-80.
  69. Blattner A, Brunner-Agten S, Ludin K, et al. Detection of germline rearrangements in patients with alpha- and beta-thalassemia using high resolution array CGH. *Blood Cells MolDis* 2013;51:39-47.
  70. Gilad O, Dgany O, Noy-Lotan S, et al. Characterization of two unique alpha-globin gene cluster deletions causing alpha-thalassemia in Israeli Arabs. *Hemoglobin* 2014;38:319-24.
  71. Jiang H, Liu S, Zhang YL, et al. Association of an alpha-globin gene cluster duplication and heterozygous beta-thalassemia in a patient with a severe thalassemia syndrome. *Hemoglobin* 2015;39:102-6.
  72. Liu S, Jiang H, Wu MY, et al. Thalassemia Intermedia caused by 16p13.3 sectional duplication in a beta-Thalassemia Heterozygous child. *Pediatr Hematol Onco J* 2015;32:349-53.
  73. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009;55:641-58.
  74. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17:333-51.
  75. Clark BE, Shooter C, Smith F, et al. Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters. *Int J Lab Hematol* 2017;39 Suppl 1:111-20.
  76. Shooter C, Rooks H, Thein SL, et al. Next generation sequencing identifies a novel rearrangement in the HBB cluster permitting to-the-base characterization. *Hum Mutat* 2015;36:142-50.
  77. Clark B, Shooter C, Smith F, et al. Beta thalassaemia intermedia due to co-inheritance of three unique alpha globin cluster duplications characterised by next generation sequencing analysis. *Br J Haematol* 2018;180:160-4.
  78. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94:441-8.
  79. Hastings R, de Wert G, Fowler B et al. The changing landscape of genetic testing and its impact on clinical and laboratory services and research in Europe. *Eur. J Hum Genet* 2012;20: 911-6.
  80. Danjou F, Anni F, Perseu L et al. Genetic modifiers of beta-thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. *Haematologica* 2012;97:989-93.
  81. Badens C, Joly P, Agouti I et al. Variants in genetic modifiers of beta-thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease. *Haematologica* 2011;96:1712-4.
  82. Shevchenko Y, Bale S. Clinical versus research sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a025809.
  83. Brancaloni V, Di Pierro E, Motta I, et al. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol* 2016;38 Suppl 1:32-40.
  84. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 2012;30:1033-6.
  85. Zebisch A, Schulz E, Grosso M, et al. Identification of a novel variant of epsilon-gamma-delta-beta thalassemia highlights limitations of next generation sequencing *Am J Hematol* 2015;90: E52-3.
  86. Martinez-Martin N, Magnus D. Privacy and ethical challenges in next-generation sequencing. *Expert Rev Precis Med Drug Dev* 2019;4:95-104.
  87. Higgs DR, Weatherall DJ. The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1154-62.
  88. Higgs DR. The molecular basis of alpha-thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, and Watherall DJ, eds. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management*, 2nd ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 2009:241-65.
  89. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet JRare Dis* 2010;5:13
  90. Flint J, Hill A, Bowden D, et al. High frequencies of  $\alpha$ -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* 1986;321:744-50.
  91. Weatherall DJ: Genetic variation and susceptibility to infection: the red cell and malaria. *Br J Haematol*

- 2008;141:276-86.
92. Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Metaxotou-Mavrommati A, et al. Distinct phenotypic expression associated with a new hyperunstable alpha globin variant (Hb Heraklion,  $\alpha 1\text{cd}37(\text{C}2)\text{Pro}>0$ ): comparison to other  $\alpha$ -thalassemic hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:276-84.
  93. Liebhaber SA, Kan YM. Differentiation of the mRNA transcripts origination from  $\alpha 1$ - and  $\alpha 2$  globin loci in normals and alpha-thalassemics. *J Clin Invest* 1981;68:439-46.
  94. Galanello R, Cao A. Alpha thalassemia. *Genet Med* 2011;13:83-8.
  95. Liebhaber SA. Alpha Thalassemia. *Hemoglobin* 1989; 13:685-731.
  96. Surapolchai P, Chuansumrit A, Sirachainan N, et al. A molecular study on the role of alpha-hemoglobin-stabilizing protein in hemoglobin H disease. *Ann Hematol* 2017;96:1005-14.
  97. Higgs DR, Lamb J, Aldridge BE, et al. Inadequacy of Hb Bart's as an indicator of alpha thalassaemia. *Br J Haematol* 1982;51:177-8.
  98. Chandra D, Tyagi S, Deka R, et al. Utility of screening golf ball inclusions in hemoglobin H disease and its clinico-hematological profile. *J Appl Hematol* 2017;8:135-9.
  99. Sansone G, Sciaratta GV, Ivaldi G, et al. Hb H-like in red cells of patients with unstable haemoglobin. *Haematologica* 1987;72:481-6.
  100. Old J, Hartevelde CL, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of Thalassaemias and other haemoglobin disorders. Vol 2: Laboratory Protocols. 2nd edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2012.
  101. Galanello R, Pirastu M, Melis MA, et al: Phenotype-genotype correlation in haemoglobin H disease in childhood. *J Med Genet* 1983;20:425-9.
  102. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, et al: Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Br J Haematol* 2000; 111:915-23.
  103. Kattamis C, Tzotzos S, Kanavakis E, et al. Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin H disease. *Lancet* 1988;1:442-4.
  104. Mirabile E, Samperi P, Di CA, et al: Phenotype-genotype correlation in Sicilian patients with Hb H. *Eur J Haematol* 2000;65:306-9.
  105. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev* 2003;17:43-53.
  106. Bain BJ. Hemoglobinopathy diagnosis. Second edition. Blackwell Publishing Ltd, 2006.
  107. Tan ASC, Quah TC, Low PS, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001;98:250-1.
  108. Randolph TR. Pathophysiology of compound heterozygotes involving hemoglobinopathies and thalassemias. *Clin Lab Sci* 2008;21:240-8.
  109. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, et al., eds. Disorders of Hemoglobin, Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, 2nd ed. Cambridge University Press, 2009.
  110. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3: a011858.
  111. Perutz M. Structure of hemoglobin. *Brookhaven Symp Biol* 1960;13:165-83.
  112. Perutz M. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 1970;228:726-39.
  113. Perutz M, Lehmann H. Molecular pathology of human haemoglobin. *Nature* 1968;219:902-9.
  114. Sansone G, Carrell RW, Lehmann H. Haemoglobin Genova: beta-28 (B10) leucine replaced by proline. *Nature* 1967;214:877-9.
  115. Beretta A, Prato V, Gallo E, et al. Haemoglobin Torino  $\alpha 43$  (CDI) Phenylalanine $\rightarrow$ Valine. *Nature* 1968;217:1016-8.
  116. Nute PE, Stamatoyannopoulos G, Hermodson MA, et al. Hemoglobinopathic erythrocytosis due to a new electrophoretically silent variant, Hemoglobin San Diego ( $\beta 109$  (G11) Val $\rightarrow$ Met) *J Clin Invest* 1974;53:320-8.
  117. Pagano L, Flagiello A, Tedesco R, et al. Hb J-Cape Town [ $\alpha 92(\text{FG}4)\text{Arg}>\text{Gln}$  ( $\alpha 1$ ), CCG $>$ CAG] in Southern Italy found in a patient with erythrocytosis. *Hemoglobin* 2007;31:113-20.
  118. Kutlar F, Hilliard LM, Zhuang L, et al. Hb M Dothan [ $\beta 25/26$  (B7/B8)/ (GGT/ GAG $>$  GAG//Gly/Glu $>$ Glu); a new mechanism of unstable methemoglobin variant and molecular characteristics. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:235-8.
  119. Gerald PS, Efron ML. Chemical studies of several varieties of Hb M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1758-67.
  120. Curcio C, Giannone V, Benzoni E, et al. Hb Milano [ $\alpha 109(\text{G}16)\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}$  (CTG $>$ CCG); HBA1: c.329T $>$ C]: A Novel Variant on the  $\alpha 1$ -Globin Gene in an Italian Family. *Hemoglobin* 2019;43:4-6.
  121. Vidaud M, Gattoni R, Stevenin J, et al. A 5' splice-region G $>$ C mutation in exon 1 of the human beta-globin gene inhibits pre-mRNA splicing: a mechanism for beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1041-5.
  122. Schiliro G, Musumeci S, Pizzarelli G, et al. Haemoglobin Lepore Boston-Washington in Sicily: clinical, haematological, and biosynthetic studies. *J Med Genet*. 1980;17:179-82.
  123. Traeger J, Wood WG, Clegg JB, et al. Defective synthesis of HbE is due to reduced levels of beta E mRNA. *Nature* 1980;288:497-9.
  124. Podda A, Galanello R, Maccioni L, et al. Hemoglobin Cagliari (beta 60 [E4] Val $>$ Glu): a novel unstable thalassemic hemoglobinopathy. *Blood* 1991;77:371-5.
  125. Yang Y, Lou JW, Liu YH, et al. Screening and diagnosis of Hb Quong Sze [HBA2: c.377T $>$ C (or HBA1)] in a prenatal control program for thalassemia. *Hemoglobin* 2014;38:158-60.
  126. Hunt DM, Higgs DR, Winichagoon P, et al. Haemoglobin Constant Spring has an unstable alpha chain messenger RNA. *Br J Haematol* 1982;51:405-13.
  127. Ivaldi G, David O, Baffico M, et al. Hb Trento: an elongated C-terminal beta chain due to a new frameshift mutation [ $\beta 144$  (-A)]. *Hemoglobin* 2003;27:15-25.
  128. Divoky V, Baysal E, Schiliro G, et al. A mild type of Hb Sbeta(+)-thalassemia [-92(C $\rightarrow$ T)] in a Sicilian family. *Am J Hematol* 1993;42:225-6.
  129. Gibbons R, Higgs DR, Olivieri NF, et al. The  $\beta$  and  $\delta\beta$  thalassaemias in association with structural haemoglobin variants. In: Weatherall DJ, Clegg JB, eds. *The Thalassaemia Syndromes* (Fourth ed). Oxford (UK): Blackwell Science, 2001:393-449.
  130. Bain BJ. Other significant haemoglobinopathies. In: *Haemoglobinopathy Diagnosis* (2nd ed). Malden, MA: Blackwell Publishing, 2006:201-11.
  131. Montalembert M, Ferster A, Colombatti R, et al. ENERCA clinical recommendations for disease management and prevention of complications of sickle cell disease in children. *Am J Hematol* 2011;86:72-5.
  132. Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A2. *Int J Lab Hematol* 2012;34:1-13.
  133. Ohba Y, Hattori Y, Sakata S, et al. Hb Niigata [ $\beta 1$  (NA1) Val $\rightarrow$ Leu]: the fifth variant with retention of the initiator

- methionine and partial acetylation. *Hemoglobin* 1997;21:179-86.
134. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:153-63.
  135. Kutlar F, Hilliard LM, Zhuang L, et al. Hb M Dothan [beta 25/26 (B7/B8)/(GGT/GAG-GAG//Gly/Glu-Glu); a new mechanism of unstable methemoglobin variant and molecular characteristics. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:235-8.
  136. Woodi M, Mondal AK, Padmanabhan B, et al. Analysis of protein posttranslational modifications by mass spectrometry: With special reference to haemoglobin. *Indian J Clin Biochem* 2009;24:23-9.
  137. Troxler H, Kleinert P, Schmugge M et al. Advances in hemoglobinopathy detection and identification. *Adv Clin Chem* 2012;57:1-28.
  138. Kleinert P, Schmid M, Zurbriggen K et al. Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of hemoglobin variants. *Clin Chem* 2008;54:69-76.
  139. Hartevelde CL, Phylipsen M, Giordano PC. Genetic mosaicism and hemoglobinopathies; uniparental isodisomy. *Blood* 2013;122:2258.
  140. Schiemsy T, Van Hoovels L, Desmet K, et al. A mosaic expression of a Hb J-Amiens (HBB: c.54G>T; p.Lys18Asn) and its interference with Hb A1c Analysis. *Hemoglobin* 2015;39:435-7.
  141. Zhao J, Li J, Lai Q, et al. Combined use of gap-PCR and next-generation sequencing improves thalassaemia carrier screening among premarital adults in China. *J Clin Path Lab Med* 2020;73:488-92.
  142. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 2011;117:6681-4.
  143. Barberio G, Ivaldi G. Prevenzione, diagnosi e consulenza nell'era della Next Generation Sequencing. In: *Emoglobinopatie dalla diagnosi alle consulenze specialistiche*. Padova: Piccin ed,2020:84-8.
  144. Tafra C, Paizi A, Borg J et al. Genomic variation in the MAP3K5 gene is associated with beta-thalassemia disease severity and hydroxyurea treatment efficacy. *Pharmacogenomics* 2013;14:469-83.
  145. Borg J, Phylactides M, Bartsakoulia M et al. KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in beta-hemoglobinopathy patients. *Pharmacogenomics* 2012;13:1487-500.
  146. Cappellini MD, Porter JB, Viprakasit V, et al. A paradigm shift on beta-thalassaemia treatment: how will we manage this old disease with new therapies? *Blood Rev* 2018;32:300-11.
  147. Katsantoni, E. Omics studies in hemoglobinopathies. *Mol Diagn Ther* 2019;23:223-34.

## Comparison of Albumin-Bilirubin grade with Child-Pugh and Model for End Stage Liver Disease scores in chronic liver disease

Sujatha Rajaragupathy, Jayagowri Karthikeyan, Lavanya Natarajan

PSG Institute of Medical Sciences and Research, Coimbatore, Tamilnadu, India

### ABSTRACT

**Introduction:** chronic liver diseases are characterized by injury to hepatocytes, chronic inflammation and progressive substitution of liver parenchyma by scar tissue or fibrosis. Albumin-bilirubin grade (ALBI) includes serum albumin and bilirubin levels, two most commonly performed and cost-effective parameters measured in the Clinical Laboratory. This study aims to establish an association between ALBI grade and Model for End stage Liver Disease (MELD) and Child-Pugh (CP) scores among chronic liver disease patients.

**Methods:** after ethical approval, information such as age, gender, provisional diagnosis, serum albumin and serum total bilirubin levels, prognostic scores of patients with liver disease were obtained from patient records. Albumin-bilirubin grading system was calculated as following:  $[\log_{10} \text{bilirubin } (\mu\text{mol/L}) \times 0.66] + [\text{albumin (g/L)} \times -0.0852]$ .

**Results:** this cross-sectional descriptive study recruited 100 patients with chronic liver disease and 100 healthy controls. Alcoholism was the common aetiology among the cases. ALBI was calculated; the mean (SD) grade among cases and controls were -0.94 (0.15) and -3.17 (0.23) respectively with a p-value of <0.001. There was statistically significant difference in ALBI grades between CP scores B and C (p value = 0.001). Pearson's correlation between MELD score and ALBI grade showed a statistically significant correlation (r = 0.723 with significance 0.001).

**Discussion:** our study demonstrated that there was a significant association between ALBI grade and the most commonly used prognostic scores such as CP and MELD.

### INTRODUCTION

Chronic liver diseases are characterized by injury to hepatocytes, chronic inflammation and progressive substitution of liver parenchyma by scar tissue or fibrosis. Chronic liver diseases arise from various causes; the most common being alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD). However, other relevant causes exist: infections, toxins, metabolic and autoimmune causes, malignancy.

The prognosis of chronic liver diseases is being assessed by scores like Child Pugh (CP) and Model for End stage Liver Disease (MELD). CP score calculation requires albumin, bilirubin, International Normalized Ratio, presence of hepatic encephalopathy and ascites. The presence of encephalopathy and ascites require a subjective evaluation; albumin serum concentration and ascites are related to each other leading to variations in grading. MELD score calculation requires serum creatinine, bilirubin and International Normalized Ratio; it is well known that serum creatinine values are influenced

by factors like age, gender, muscle mass causing a large variation among individuals. A number of studies have shown that variability in creatinine and International Normalized Ratio determination in different laboratories have led to inconsistency in MELD scores (1,2). As CP and MELD scores show the mentioned limitations, there is an urgent need for other prognostic markers.

One novel indicator is the Albumin-Bilirubin (ALBI) grade utilized by Johnson et al. in 2015 for hepatocellular carcinoma (3). The ALBI grade includes serum albumin and bilirubin levels, the two most commonly performed and cost-effective parameters that are a part of routine liver function tests. Since the first paper, various studies have been carried on to verify its effectiveness and usefulness in hepatocellular cancer. Wang et al. conducted a study to compare ALBI grade with CP score and concluded that ALBI was better than CP in distinguishing patients into different groups based on prognosis of liver cancer; post-operative survival was also better defined in ALBI-classified patients than in CP-classified groups (4). A massive research had been done

Corrispondenza a: Sujatha Rajaragupathy, Department of Biochemistry, PSG Institute of Medical Sciences and Research, Coimbatore, Tamilnadu, India - 641004, Tel 91-9487539777, E-mail suja1357@gmail.com

Ricevuto: 31.08.2020

Revisionato: 16.10.2020

Accettato: 16.11.2020

Pubblicato on-line: 10.02.2021

DOI: 10.19186/BC\_2020.100

to support the usefulness of ALBI in the prognosis of liver cancer; however, studies that associate ALBI grade with liver diseases caused by different aetiologies are sparse (5, 6). ALBI grade has been studied to prognosticate 3-month outcome in patients with liver diseases induced by Hepatitis-B virus (7). A study by Chan AW et al. proved that ALBI is an independent marker for the prognosis of primary biliary cirrhosis (8).

A grading score to prognosticate liver diseases of any aetiology is essential for preventing its advancement to cirrhosis, malignancy or failure. This will aid clinicians and epidemiologists to provide treatment and prevention measures respectively and thereby decrease the morbidity and mortality due to liver diseases. Hitherto, ALBI grading has been studied in hepatocellular cancer survival and prognosis. Only few studies are available regarding the usage of ALBI grading in liver diseases other than cancer. This study is aimed to verify the usefulness in clinical practice of two simple, objective and commonly performed laboratory parameters to prognosticate liver diseases.

## METHODS

After obtaining approval from the Institutional Human Ethics Committee (IHEC), this descriptive cross-sectional study was conducted in a tertiary care centre. The study has been carried out according to the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2013.

The study participants were divided into two groups – cases and controls. The cases included all patients diagnosed with liver disease who consulted medicine and gastroenterology department during the study period of one year. Information such as age, gender, provisional diagnosis, laboratory parameters like serum albumin and total bilirubin levels, CP and MELD scores were obtained from the medical records. Subsequently personal identifiers were removed. Since there was no direct contact between the investigator and participants, a waiver of consent was obtained from Ethics Committee.

The control group included healthy participants attending their routine health check-up screening and had no evidence of liver disease as per clinical and laboratory data. Patients with liver disease and without CP and MELD scores were excluded from the study. Patients with malignancy and renal diseases were excluded due to the impact on synthesis and excretion of albumin. Patients with anaemia, gall stones and those on drugs like sulphonamides, anti-psychotics, chemotherapy were excluded due to the influence of the therapy on bilirubin levels.

Based on the recently estimated serum albumin and total bilirubin levels, ALBI grade of each patient was calculated using the formula reported below. Using serum albumin (g/L) and serum total bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ ), the ALBI grade was calculated as follows (3):

$$ALBI = 0.66 \times (\log_{10} \text{Total Bilirubin}) + \text{Serum albumin} \times (-0.085)$$

The ALBI grades were statistically compared among cases and controls. Serum albumin was estimated using Bromocresol Green method (end-point) and serum bilirubin was assayed using Diazo method (end-point) in auto-analyzer (Cobas 6000) using dedicated kits and reagents from the manufacturer (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany).

## Statistical analysis

Student's t-test was used to compare continuous variables and Chi-square test for categorical variables. Pearson's correlation was employed to examine the relationship between clinical variables. ANOVA was done to compare significance between different groups.  $p < 0.05$  was considered as significant. Bonferroni's correction was used to compare the two groups when there was a statistically significant difference in group means revealed by one-way ANOVA. ROC curve analysis was done to predict the accuracy of the new grading with established scoring systems. Statistical Package for the Social Sciences version 24 was used for statistical analysis.

## RESULTS

This cross-sectional descriptive study recruited 100 cases with chronic liver disease and 100 healthy controls without liver disease. The mean (SD) age group of cases and controls were 50.36 (10.23) years and 50.51 (11.97) years respectively, with a p-value of 0.751. There were 12 females and 88 males among cases, and 20 females and 80 males among controls. Chi square test done to assess the significance of gender among the study groups revealed a p-value of 0.625. Hence, both the study groups were age and gender matched. The demographic characteristics of cases group are shown in Table 1.

**Table 1**  
*Demographic characteristics of the cases*

Characteristics	Cases
Age	50.36 $\pm$ 10.23 years
Number of females	12 (12%)
Number of males	88 (88%)
Serum albumin, mean (SD)	2.5 (0.4)
Serum bilirubin, mean (SD)	6.9 (0.7)
Number of cases with CP-A	2
Number of cases with CP-B	43
Number of cases with CP-C	55
MELD score, mean (SD)	21.83 (7.1)

*CP-A, CP-B, CP-C, Child Plug groups A, B and C; MELD, Model for end stage liver disease score; SD, Standard deviation*

Alcohol stood as the major aetiology for 56% of the chronic liver disease patients; 13% had NAFLD. The

distribution of cases with other aetiologies was as follows: viral hepatitis 13%, cryptogenic 10%, autoimmune 4%, primary biliary cirrhosis 2%, Budd-Chiari syndrome 1%, and Wilson’s disease 1%.

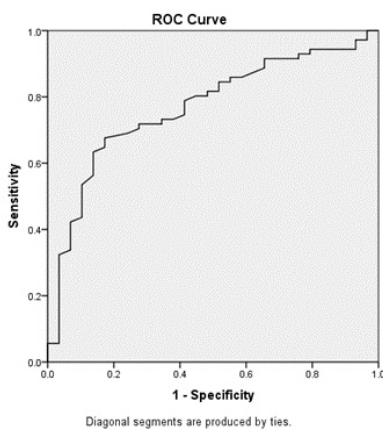
The mean (SD) ALBI grade among cases was -0.94 (0.15) and among controls was -3.17 (0.23). It was found to be significantly different among the two groups with p-value of <0.001.

Based on CP score, liver disease patients were classified into three groups namely CP-A (n=2), CP-B (n=30), CP-C (n=68). The mean (SD) of the ALBI scores among the three CP scores A, B, C are -1.48 (0.27), -1.42 (0.30) and -0.87 (0.19) respectively. The ALBI grade between these groups was compared using ANOVA showing a significant difference in the ALBI grade between CP-A, CP-B and CP-C patients (p value=0.001). Bonferroni test revealed a statistically significant difference in ALBI grades between CP B and C (p value = 0.001) (Table 2). ROC curve analysis was done to predict how accurately ALBI grading can be used to discriminate between patients with CP-B and CP-C. This provides an area under the curve of 0.786 with the 95% CI (0.669-0.867) (Figure 1).

**Table 2**  
Post hoc analysis of ALBI grade with Child Pugh scores of liver disease patients

CP score	Mean Difference (95% Confidence Interval)	Standard Error	p-value
CP-A versus CP-B	-0.245 (-1.084 – 0.593)	0.344	1.000
CP-B versus CP-C	-0.423* (-0.682 – (-0.164))	0.106	0.001*
CP-C versus CP-A	0.668 (-0.152 – 1.489)	0.337	0.150

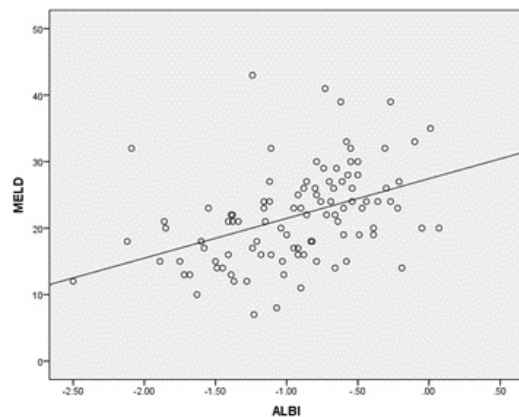
CP-A, CP-B, CP-C, Child Pugh groups A, B and C; MELD, Model for end stage liver disease score; SD, Standard deviation \*p value < 0.05 is considered significant



**Figure 1**  
ROC curve analysis of ALBI grading AUC with 95% CI = 0.768

CP-Apatients were excluded from the ROC curve calculation sincethere were only 2 participants in this group.

Pearson’s correlation between MELD score and ALBI grade showed a statistically significant correlation (r = 0.723 with two-tailed significance 0.001). Scatter plot showing the correlation between MELD and ALBI is depicted in Figure 2. On the basis of aetiology, liver disease patients were divided into three categories as alcoholic liver disease, NAFLD and other aetiologies. The mean (SD) ALBI scores in the alcoholic liver disease, non-alcoholic fatty liver disease and other aetiologies groups were -0.79 (0.17), -1.03 (0.25) and -1.33 (0.25) respectively. The ALBI grade between these groups compared using ANOVA showed that there is a significant difference in the ALBI grade between the three categories (p value=0.001). Bonferroni test (post-hoc analysis) revealed a statistically significant difference in ALBI grades between alcoholic liver disease and other aetiologies (p - 0.001) while there was no statistically significant difference between alcoholic liver disease and NAFLD (Table 3).



**Figure 2**  
Scatter-plot showing correlation between MELD and ALBI

**Table 3**  
Comparison of ALBI grade among alcoholic liver disease, NAFLD and other aetiologies of liver disease

Aetiology	Mean Difference (95% Confidence Interval)	Standard Error	p-value
Alcohol versus NAFLD	0.534 (-0.079 – 1.149)	0.254	0.111
NAFLD versus Other aetiologies	1.350* (0.770-1.929)	0.240	0.001*
Other aetiologies versus Alcohol	-1.884* [-2.202 – (-1.567)]	0.131	0.001*

CP-A, CP-B, CP-C, Child Pugh groups A, B and C; MELD, Model for end stage liver disease score; SD, Standard deviation \*p value < 0.05 is considered significant

## DISCUSSION

This paper was aimed to study the ALBI grades in chronic liver disease patients of aetiologies other than hepatocellular cancer. Most of the liver disease patients in the study population were around the age of fifty and males outweighed in all aetiologies of liver disease.

The etiological profile of the patients with liver disease revealed alcoholism as the foremost among all causes. There is a rise in alcohol related liver disease in the developing countries; this can be attributed to the increasing income *per capita*s as well trends of increasing consumption as part of urbanization, migration and embracing western lifestyle in these countries.

ALBI grade was introduced by Johnson et al (3); the different grades of the score are:  $\leq -2.60$  (ALBI grade 1),  $> -2.60$  to  $\leq -1.39$  (ALBI grade 2), and  $> -1.39$  (ALBI grade 3). This simple and objective score demonstrated its usefulness in the evaluation of prognosis in patients with liver cancer (3). This study demonstrated that liver disease patients belong to grade 3 [-3.17(0.23)] as compared to participants without liver disease who belong to grade 1 [-0.94(0.15)]. The rationale of the marker is that in liver disease, albumin synthesis is decreased due to the destruction of hepatocytes and bilirubin levels are raised due to the impaired metabolism of bilirubin.

The study also analysed the association between CP score and ALBI grading and revealed that ALBI was significantly different in the patients with CP-B and C scores. This finding was consistent with the results of the study by Fragakiet al and Chen et al. CP-C indicates worse prognosis and this study shows that these patients are correctly identified by using ALBI grading- a more cost-effective tool (7, 9). However the association of ALBI grading with significant difference only among CP-B and -C is due to the under representation of CP-A category among the cases. The findings of this study were in contradiction to those by Johnson et al. who showed that within the CP-A class there were two distinct patient groups showing significant differences in survival outcomes that ALBI grading was able to discriminate (3).

Furthermore, this study depicts a good correlation between MELD scores and ALBI grading with an r value of 0.723. This was consistent with findings in a retrospective study conducted by Deli Zou et al. where it was demonstrated that ALBI grade was comparable with CP and MELD to prognosticate acute upper gastrointestinal bleeding due to liver cirrhosis (10). We found that ALBI grade had a moderate to high prognostic performance.

This study verified that ALBI grading was significantly different in liver disease due to alcoholism and other causes such as autoimmune or viral infections. However, there was no difference in ALBI between alcoholic liver disease and NAFLD. This might be because of the presence of a greater number of cases with alcoholism and very few cases with other causes.

However large-scale studies are required to establish a significant association. Our study concluded that there was significant association between ALBI and the commonly used severity and prognostic scores such as CP and MELD.

The limitations of this study are twofold: first, it was conducted in a single tertiary care centre with a relatively small number of cases; second, a follow-up of patients to assess the prognostic implications and their overall survival in relation to their ALBI grading is required.

This study has expanded the usage of ALBI in multiple aetiologies of chronic liver disease. It will be useful in the future to analyse each etiological category separately with an adequate number of patients for different diagnosis.

It can be concluded that ALBI grade is economically and technically feasible and could thus become one of the biomarkers to be used in many clinical services from primary health care centre to a tertiary care multispecialty centre. ALBI grading could be used as a cost-effective tool to measure disease severity in liver disease patients as a surrogate marker to existing scores.

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## REFERENCES

1. Cholongitas E, Marelli L, Kerry A et al. Different methods of creatinine measurement significantly affect MELD scores. *Liver Transpl* 2007;13:523-9.
2. Porte RJ, Lisman T, Tripodi A et al. Coagulation in Liver Disease Study Group. The International Normalized Ratio (INR) in the MELD score: problems and solutions. *Am J Transplant* 2010;10:1349-53.
3. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C et al. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *J Clin Oncol* 2015;33:550-8.
4. Wang YY, Zhong JH, Su ZY et al. Albumin-bilirubin versus Child-Pugh score as a predictor of outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2016;103:725-34.
5. Chan AW, Kumada T, Toyoda H et al. Integration of albumin-bilirubin (ALBI) score into Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) system for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:1300-6.
6. Xu YX, Wang YB, Tan YL et al. Prognostic value of pretreatment albumin to bilirubin ratio in patients with hepatocellular cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e14027.
7. Chen B, Lin S. Albumin-bilirubin (ALBI) score at admission predicts possible outcomes in patients with acute-on-chronic liver failure. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e7142.
8. Chan AW, Chan RC, Wong GL, et al. New simple prognostic score for primary biliary cirrhosis: Albumin-bilirubin score. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:1391-6.
9. Fragaki M, Sifaki-Pistolla D, Orfanoudaki E, et al. Comparative evaluation of ALBI, MELD, and Child-Pugh scores in prognosis of cirrhosis: is ALBI the new alternative? *Ann Gastroenterol* 2019;32:626-32.

10. Zou D, Qi X, Zhu C, Ning Z, et al. Albumin-bilirubin score for predicting the in-hospital mortality of acute upper gastrointestinal bleeding in liver cirrhosis: A retrospective study. *Turk J Gastroenterol* 2016;27:180-6.

## Valutazione degli anticorpi anti SARS-CoV-2 nell'ambito di un progetto di costituzione di una banca di plasma iperimmune

Gianluca Gessoni<sup>1</sup>, Lauretta Moro<sup>1</sup>, Marina Orfano<sup>2</sup>, Michela Pivetta<sup>1</sup>, Ruggero Dittadi<sup>3</sup>, Monia Pacenti<sup>4</sup>,  
Giustina De Silvestro<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Medicina Trasfusionale della ULSS 3 Serenissima

<sup>2</sup>Servizio di Medicina Trasfusionale della ULSS 4 Veneto Orientale

<sup>3</sup>Servizio di Medicina di Laboratorio della ULSS 3 Serenissima

<sup>4</sup>Servizio di Microbiologia e Virologia della Azienda Ospedaliera di Padova

<sup>5</sup>Servizio di Medicina Trasfusionale della Azienda Ospedaliera di Padova

### ABSTRACT

#### SARS-COV-2 antibodies in patients candidates as donors of immune plasma.

Background: in this study SARS-CoV-2 serology was investigated, using three different methods, in a cohort of convalescent patients from SARS-CoV-2 infection, recruited for the establishment of a hyperimmune plasma bank.

Methods: SARS-CoV-2 serology was investigated in 326 subjects using three commercial methods: MAGLUMI (MAG) 2019-nCoV IgM CLIA, MAGLUMI 2019-nCoV IgG CLIA and DiaSorin (SOR) LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG. Moreover, 143 subjects were tested using a plaque reduction micro neutralization assay.

Results: MAG IgG test and SOR IgG test showed a good agreement (Cohen's K index = 0.65, CI 95% 0.55 – 0.78). Considering SOR IgG test *versus* micro neutralization test, the observed cut-off values were: 85 AU/mL for a neutralizing titer of 1/80; 108 AU/mL for 1/160 titer and 144 AU/mL for 1/320 titer. Considering MAG IgG test *versus* micro neutralization test, the observed cut-off values were: 4 AU/mL for a neutralizing titer of 1/80, 5 AU/mL for 1/160 titer and 7 AU/mL for 1/320 titer.

Conclusions: in our experience, the MAG and SOR tests showed good agreement in identifying subjects with IgG antibodies to SARS-CoV-2. Obtained results confirmed a good correlation between the antibody concentration detected by the SOR IgG and the neutralizing titer determined by the plaque reduction test.

### INTRODUZIONE

Al momento non esistono evidenze incontrovertibili sulla efficacia della terapia con plasma iperimmune nei pazienti affetti da COVID 19 (1), tuttavia alcuni studi ne hanno evidenziato il possibile effetto positivo (2,3). Pertanto anche in Italia sono stati iniziati degli studi clinici di tipo interventistico al fine di valutare la efficacia del trattamento con plasma iperimmune ottenuto da pazienti/donatori guariti dalla infezione da SARS-CoV-2.

La definizione di plasma iperimmune non è ancora univocamente definita sia in riferimento alla metodica di determinazione degli anticorpi sia relativamente alla concentrazione degli stessi da utilizzare come valore soglia per poter definire come "iperimmune" un plasma "convalescente". Da un punto di vista metodologico

sembra esservi convergenza nell'indicare il metodo di neutralizzazione quale riferimento (4-6); sul titolo anticorpale invece le indicazioni sono ancora difformi con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che indica tassativamente un titolo >1/160 (4), la Food and Drug Administration statunitense (FDA) che ammette anche un titolo >1/80 (5) mentre le linee guida Europee raccomandano un titolo >1/320 (6).

Scopo del presente lavoro è quello di riportare alcuni dati sulla sierologia per SARS-CoV-2 valutata con tre diverse metodiche, in una coorte di soggetti convalescenti dopo COVID-19 reclutati per la costituzione di una banca di plasma "iperimmune" presso il Dipartimento Interaziendale di Medicina Trasfusionale della provincia di Venezia (DIMT).

Corrispondenza a: Gianluca Gessoni, Dipartimento Interaziendale di Medicina Trasfusionale della provincia di Venezia, Ospedale dell'Angelo, Via Paccagnella 11, 30172 Mestre VE, Tel 0419627175, E-mail gianluca.gessoni@aulss3.veneto.it

Ricevuto: 11.12.2021

Revisionato: 28.01.2021

Accettato: 08.02.2021

Pubblicato on-line: 26.02.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.008

## METODI

### Pazienti

Tra il 01/05/2020 e il 31/07/2020 sono stati valutati 326 pazienti convalescenti dopo infezione da SARS-CoV-2, con età compresa tra 18 e 60 anni (mediana 47 anni); i maschi erano 247 (76%). Tutti questi soggetti avevano presentato una infezione sintomatica come riportato in Tabella 1. In tutti l'infezione è stata confermata microbiologicamente mediante tampone molecolare oro/rino faringeo eseguito utilizzando il test Roche Cobas SARS-CoV-2 test su strumentazione Roche COBAS 6800 (7,8) e la clearance virale è stata confermata microbiologicamente (due tamponi molecolari oro/rino faringei successivi negativi). L'intervallo tra la diagnosi molecolare e la valutazione sierologica era compreso tra 45 e 120 giorni (mediana 68). Il protocollo di studio è stato autorizzato dal Comitato Etico per la Pratica Clinica della Provincia di Venezia. Ciascun soggetto arruolato ha rilasciato, per iscritto, specifico consenso informato.

### Parametri di idoneità alla donazione di plasma iperimmune

Tutti i soggetti rispondevano ai requisiti di idoneità clinico anamnestici, antropometrici, e di laboratorio per la donazione di plasma per uso clinico stabiliti dal DM 05/11/2015. Da un punto di vista microbiologico erano negativi per HBsAg, anticorpi anti-HCV, anti-HIV 1 e 2, sierologia LUE, utilizzando reattivi e strumentazione della ditta Abbott: Syphilis TP Reagent Kit, HBsAg Qualitative II Reagent Kit, Anti-HCV Reagent Kit, HIV Ag/Ab Combo Reagent Kit su strumentazione automatica Alinity. Per i test in biologia molecolare per la ricerca degli acidi nucleici virali mediante amplificazione (NAT) sono stati utilizzati reattivi e strumentazione forniti dalla ditta Grifols; per HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-1/2-RNA (Procleix Ultrio Plus Assay) e WNV (Procleix WNV Assay). Inoltre sono stati sottoposti con esito negativo a NAT testing su plasma per SARS-CoV-2 RNA, HEV-RNA

**Tabella 1**

*Sintomatologia rilevata nei 326 soggetti considerati.*

Sintomatologia	N°	%
Febbre >37,5°C	326	100,0
Anosmia / Ageneusia	274	84,0
Sintomi Respiratori	218	66,9
Artralgie	197	60,4
Astenia / Faticabilità	153	46,9
Cefalea	108	33,1
Sintomi Gastrointestinali	97	29,8
Altri sintomi	74	22,7

(Procleix HEV Assay), HAV-RNA e ParvoVirus19-DNA (Procleix Parvo/HAV Assay) su strumentazione Panther. Come criterio aggiuntivo è stata considerata la positività per le IgG (test MAGLUMI e DIASORIN) con negatività per le IgM al test MAGLUMI.

### Studio sierologico per SARS-CoV-2

In tutti i soggetti considerati sono stati ricercati, in prima istanza, gli anticorpi anti SARS CoV-2 utilizzando i test in chemiluminescenza MAGLUMI 2019-nCoV IgM (CLIA MAG IgM) e MAG 2019-nCoV IgG (CLIA MAG IgG) su strumentazione automatica MAG 800 (New Industries Biomedical Engineering Shezen, Cina. Abbiamo adottato un valore soglia a 1,1 AU/mL per le IgG e a 1,0 AU/mL per le IgM (9). Tutti i soggetti sono stati valutati anche con il test DiaSorin LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (SOR IgG) su strumentazione automatica DiaSorin Liaison XL analyzer (DiaSorin Saluggia VC Italia) utilizzando un valore soglia di positività di 15 AU/mL con una zona grigia tra le 12 e le 15 AU/mL (10).

### Test di neutralizzazione

I campioni relativi ai 143 soggetti che sono stati avviati alla plasmateresi, sono stati anche valutati mediante il metodo della micro neutralizzazione con metodica "in house". Il test viene realizzato in micropiastre da 96 pozzetti per colture cellulari eseguendo diluizioni in doppio del siero in esame. La sospensione cellulare viene aggiunta direttamente alla miscela virus-anticorpo. Per tutti i test di micro neutralizzazione viene utilizzato lo stesso lotto di preparazione virale precedentemente preparato, titolato, aliquotato e congelato. Lo stock virale utilizzato deriva dall'isolamento in coltura di un tampone nasofaringeo di un paziente, NEUCoV-4623191 (3° passaggio):  $1,2 \times 10^6$  TCID50/mL (Median Tissue Culture Infectious Dose). Lo stock virale viene diluito in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM FBS Free) ad una concentrazione finale di 2000 TCID50/mL (100 TCID 50 /pozzetto (in 50uL). L'intervallo di accettabilità della carica virale è compresa tra 100 e 200 TCID 50 /pozzetto. Il virus così diluito (50uL) viene aggiunto ai pozzetti delle diluizioni di siero da titolare partendo dalla diluizione più alta. La miscela siero-virus viene pre incubata a 37°C per 60 minuti. Tale miscela viene quindi trasferita sulla piastra dove sono state preparate le cellule VERO E6 in sospensione (circa 25 000 cellule/pozzetto da 100uL). La micropiastra viene incubata a 37°C in CO<sub>2</sub>. La lettura viene eseguita dopo 72 ore; la valutazione del titolo viene effettuata rilevando la riduzione delle placche di citolisi, che in assenza di anticorpi neutralizzanti devono corrispondere a circa 100-200 dosi infettanti/pozzetto) (11-15).

### Analisi statistica

I dati sono stati esaminati utilizzando il software MedCalc (Medcalc SW bvda Ostenda, Belgio, versione 8.0). La distribuzione dei valori è stata valutata

utilizzando i coefficienti di asimmetria e di Curtosi; la normalità è stata valutata utilizzando il test di D'Agostino-Pearson (DP). Per esprimere la distribuzione dei valori di concentrazione delle IgG sono stati utilizzate la mediana (MED) e il range interquartile (IQR). Per la valutazione della concordanza tra test abbiamo utilizzato l'indice K di Cohen con calcolo dell'intervallo di confidenza al 95% (IC 95%). Per la misura di MAG IgG e SOR IgG sono state valutate la sensibilità (SE), specificità (SP), indice di Youden ( $Y = \text{sensibilità} + \text{specificità} - 1$ ), utilizzato per stabilire i valori soglia e sono state costruite le curve ROC, con calcolo della area sottesa alla curva (AUC), e (IC 95%) verso differenti titoli (1/80, 1/160, 1/320) di anticorpi neutralizzanti (16). Le curve ROC sono state costruite utilizzando una elaborazione separata per tutti i 143 risultati disponibili per ciascun titolo di anticorpi neutralizzanti (1/80, 1/160, 1/320). A titolo esemplificativo per costruire la curva ROC per il test SOR IgG per un titolo di anticorpi neutralizzanti 1/80 abbiamo considerato come 0 i pazienti con titolo <1/80 e 1 i pazienti con titolo >1/80.

## RISULTATI

Nessuno dei soggetti considerati è risultato positivo per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1 e 2, sierologia LUE, NAT testing per HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-1-RNA, SARS-CoV-2 RNA, HAV-RNA, HEV-RNA, ParvoVirus19-DNA.

Come riportato nella Tabella 2, utilizzando i test MAG IgM e IgG in 46 soggetti (14,1%) non si evidenziava risposta anticorpale nei confronti di SARS-CoV-2, essendo risultati negativi sia per le IgG che per le IgM. Era possibile evidenziare la presenza di IgM in 42 soggetti (12,9%), in 32 casi (9,8%) associate alle IgG e in 10 casi isolate (3,1%). In 238 casi (73,0%) era possibile evidenziare solo le IgG. Per il test IgG, la distribuzione dei risultati è stata valutata e l'ipotesi di normalità è stata rifiutata dal test DP ( $p < 0,0001$ )

Utilizzando il test SOR IgG, in 43 soggetti (13,2%) non era possibile evidenziare anticorpi, in 52 (15,9%)

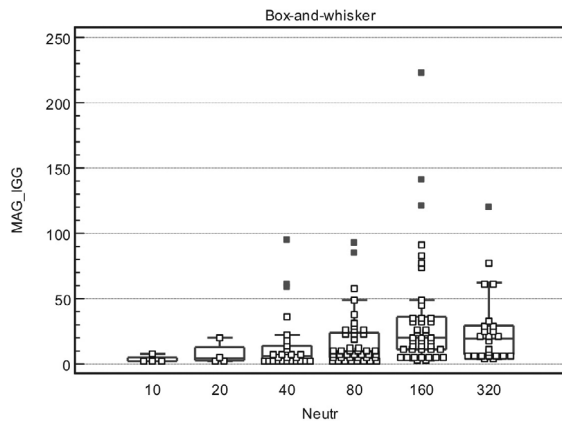
soggetti la concentrazione anticorpale era compresa tra 12 e 15 AU/mL; non essendo stato possibile effettuare una seconda determinazione delle IgG, questi campioni sono stati considerati come IgG negativi. In 231 campioni (70,9%) le IgG presentavano una concentrazione >15 AU/mL. È stata valutata la distribuzione dei risultati e l'ipotesi di normalità è stata rifiutata dal test DP ( $p < 0,0001$ ). Considerando solo gli anticorpi di classe IgG, 230 campioni erano positivi sia al test MAG che al test SOR e 55 erano negativi per entrambi i test, 1 campione era negativo al test MAG ma positivo al test SOR e 40 campioni risultavano positivi al test MAG ma negativi al test SOR. La concordanza globale (calcolata come percentuale di coppie concordanti) osservata (incidenza di ben classificati, IBC) era 0,87 e la K di Cohen era 0,65 (IC 95% 0,55 – 0,78). Tra i 46 soggetti risultati negativi ai test MAG per IgG e IgM, 32 presentavano, al test SOR un valore <2 AU/mL, 13 tra 12 e 15 UA/mL e 1 oltre 15 AU/mL. Tra i 10 soggetti con negatività per le IgG ma positività per le IgM con il test MAG, 7 erano negativi al test SOR e 3 presentavano tra 12 e 15 AU/mL. Tra i 32 soggetti positivi sia per IgG che per IgM al test MAG, utilizzando il test SOR, 2 presentavano <12 AU/mL, 24 tra 12 e 15 AU/mL, 6 >15 UA/mL. Tra i 238 soggetti positivi alle sole IgG con il test MAG, utilizzando il test SOR, 2 presentavano <12 AU/mL, 12 tra 12 e 15 AU/mL, 224 >15 AU/mL.

Tra i 236 soggetti esaminati, in base a criteri sopra menzionati, ne sono stati selezionati 143 che sono stati inviati alla plasmateresi e sottoposti al test per la titolazione degli anticorpi neutralizzanti. Dei 143 soggetti selezionati, 4 (2,8%) presentavano un titolo di 1/10, 4 (2,8%) 1/20, 26 (18,2%) 1/40, 43 (30,1%) 1/80, 42 (29,4%) 1/160, 24 (16,7%) 1/320; l'ipotesi di normalità era rifiutata dal test DP ( $p < 0,0001$ ).

La distribuzione dei valori di IgG rilevati con il test MAG ed espressi come AU/mL in relazione al titolo degli anticorpi neutralizzanti è riportata in Figura 1. Come si può osservare per un titolo di anticorpi neutralizzanti di 1/10 il valore mediano di IgG era 2,0 AU/mL (IQR 1,5 AU/mL), 4,4 AU/mL (IQR 5,3 AU/mL) per un titolo 1/20,

**Tabella 2**  
Risultati dei test Maglumi IgG/IgM e DiaSorin IgG.

	Maglumi	DiaSorin IgG		
		< 12 AU/mL	12-15 AU/mL	> 15 AU/mL
	N° Soggetti	N° Soggetti	N° Soggetti	N° Soggetti
IgG- IgM-	46	32	13	1
IgG- IgM+	10	7	3	0
IgG+ IgM+	32	2	24	6
IgG+ IgM-	238	2	12	224
TOTALE	326	43	52	231



**Figura 1**

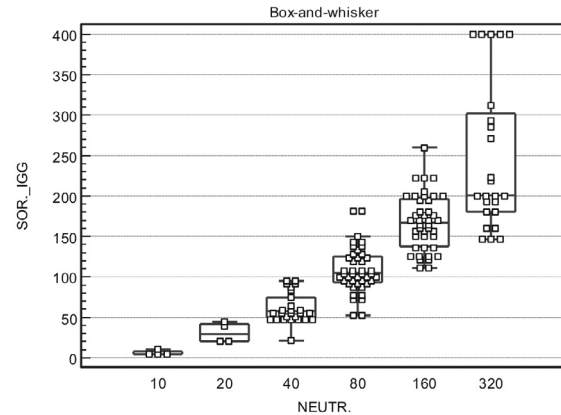
Concentrazione delle IgG rilevate con il test Maglumi in relazione al titolo di anticorpi neutralizzanti.

La figura, utilizzando il diagramma a scatola e baffi, rappresenta la distribuzione della concentrazione delle IgG quantificate con il metodo Maglumi in relazione al titolo di anticorpi neutralizzanti. Nel grafico è riportata la distribuzione dei singoli soggetti, il valore mediano osservato (linea orizzontale all'interno della scatola), il primo (Q1) e terzo (Q3) quartile (basi inferiore e superiore della scatola) e due segmenti verticali (baffi) estesi a includere tutte le osservazioni comprese tra  $Q1-1,5 \times IQR$  e  $Q3+1,5 \times IQR$ . Le osservazioni oltre i baffi (outliers) sono indicate come singoli punti, con simboli aperti o pieni (se  $<Q1-3 \times IQR$  o  $>Q3+3 \times IQR$ ). IQR, intervallo interquartile.

6,0 AU/mL (IQR 11,0 AU/mL) per un titolo 1/40, 10,5 AU/mL (IQR 18,5 AU/mL) per un titolo 1/80, 20,0 AU/mL (IQR 18,5 AU/mL) per un titolo 1/160, 19,5 AU/mL (IQR 22,3 AU/nL) per un titolo 1/320. Nella Figura 2 è riportata la distribuzione dei valori di IgG rilevati con il test SOR ed espressi come AU/mL sempre in relazione al titolo degli anticorpi neutralizzanti. Come si può osservare per un titolo di anticorpi neutralizzanti di 1/10 il valore mediano di IgG era 4,5 AU/mL (IQR 2,5 AU/mL), 29,5 AU/mL (IQR 20,3 AU/mL) per un titolo 1/20, 58,0 AU/mL (IQR 22,3 AU/mL) per un titolo 1/40, 105,0 AU/mL (IQR 31,5 AU/mL) per un titolo 1/80, 167,0 AU/mL (IQR 54,8 AU/mL) per un titolo 1/160, 201,0 AU/mL (IQR 117,0 AU/nL) per un titolo 1/320.

Analizzando le curve ROC ottenute per il test MAG IgG possiamo rilevare che per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/80 la AUC era 0,737 (IC95% 0,66-0,81), il valore soglia si poneva a 4,0 AU/mL con un indice IY di 0,37. Per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/160 la AUC era 0,703 (IC95% 0,62-0,77), il valore soglia si poneva a 5,0 AU/mL con un IY 0,34. Per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/320 la AUC era 0,591 (IC 95% 0,51-0,67), il valore soglia si poneva a 7,0 AU/mL con un IY 0,30.

Analizzando le curve ROC ottenute per il test SOR IgG, possiamo rilevare che per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/80, la AUC era 0,979 (IC95% 0,90-0,99), il valore soglia si poneva a 85 AU/mL con un IY 0,89. Per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/160 la AUC era 0,966 (IC95% 0,92-0,98), il valore soglia si poneva a 109 AU/mL con un IY 0,91. Per titoli di anticorpi



**Figura 2**

Concentrazione delle IgG rilevate con il test DiaSorin in relazione al titolo di anticorpi neutralizzanti.

La figura, utilizzando il diagramma a scatola e baffi, rappresenta la distribuzione della concentrazione delle IgG quantificate con il metodo DiaSorin in relazione al titolo di anticorpi neutralizzanti. Nel grafico è riportata la distribuzione dei singoli soggetti, il valore mediano osservato (linea orizzontale all'interno della scatola), il primo (Q1) e terzo (Q3) quartile (basi inferiore e superiore della scatola) e due segmenti verticali (baffi) estesi a includere tutte le osservazioni comprese tra  $Q1-1,5 \times IQR$  e  $Q3+1,5 \times IQR$ . Le osservazioni oltre i baffi (outliers) sono indicate come singoli punti, con simboli aperti o pieni (se  $<Q1-3 \times IQR$  o  $>Q3+3 \times IQR$ ). IQR, intervallo interquartile.

neutralizzanti pari a 1/320 la AUC era 0,917 (IC95% 0,86-0,96), il valore soglia si poneva a 144 AU/mL con un IY 0,7.

Questi dati sono riportati nella Tabella 3 e nella Figura 3.

## DISCUSSIONE

Sono stati esaminati 326 soggetti, di età compresa tra 18 e 60 anni, tutti con pregressa infezione da SARS-CoV-2 documentata microbiologicamente (tamponi rino-orofaringeo positivo) e risoluzione della infezione documentata microbiologicamente (due tamponi rino-orofaringei negativi); tutti i soggetti erano stati sintomatici rientrando nelle classi 2-6 della "WHO progression scale" (6). Il periodo intercorrente tra la diagnosi microbiologica di infezione da SARS-CoV-2 e il prelievo, era compreso tra 45 e 120 giorni, al momento del prelievo in tutti è stata eseguita, con esito negativo, la ricerca di SARS-CoV-2 RNA circolante.

La osservazione di IgM circolanti, osservate durante lo studio, non sembra quindi correlare con la presenza di viremia.

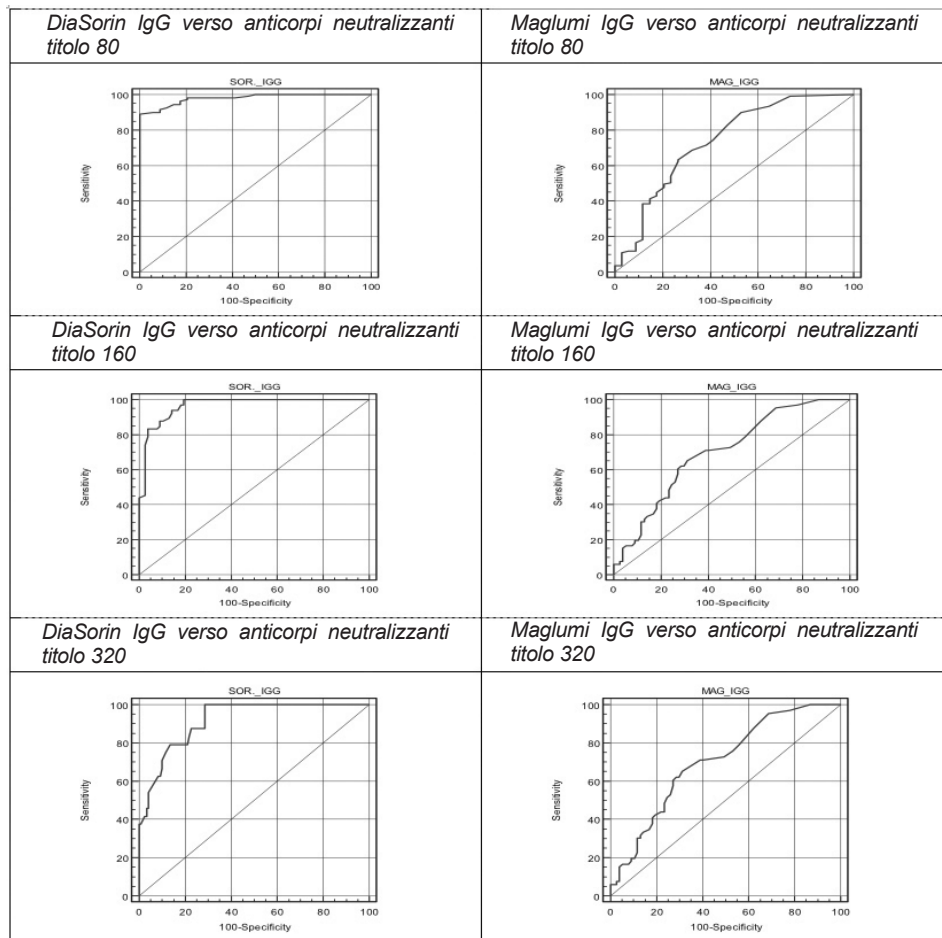
I limiti dello studio devono essere ricercati nella strategia di campionamento dei soggetti, teso al reclutamento di pazienti/donatori per la raccolta di plasma iperimmune. Pertanto i criteri di selezione hanno fatto sì che la popolazione esaminata fosse costituita in larghissima prevalenza da uomini, dato che in Italia non è ammessa la donazione di plasma per uso clinico di soggetti che abbiamo avuto eventi, come la gravidanza,

**Tabella 3**

Valori soglia per i test DiaSorin IgG e Maglumi IgG verso differenti titoli di anticorpi neutralizzanti.

Titolo Anticorpi neutralizzanti	Valore soglia	Sensibilità	Specificità
Test DiaSorin IgG			
80	85 AU/mL	0,89 IC95% 0,84-0,94	1,00 IC95% 0,94-1,00
160	109 AU/mL	1,00 IC95% 0,96-1,0	0,81 IC95% 0,75-0,86
320	144 AU/mL	1,00 IC95% 0,95-1,00	0,71 IC95% 0,67-0,74
Test Maglumi IgG			
80	4 AU/mL	0,90 IC95% 0,85-0,95	0,47 IC95% 0,41-0,52
160	5 AU/mL	0,65 IC95% 0,61-0,69	0,69 IC95% 0,623-0,75
320	7 AU/mL	0,91 IC95% 0,87-0,95	0,29 IC95% 0,26-0,32

IC95%, intervallo di confidenza al 95%



**Figura 3**

Curve ROC dei test IgG DiaSorin e Maglumi verso differenti titoli di anticorpi neutralizzanti

in grado di evocare risposta immune verso gli antigeni HLA con possibilità di generare complicazioni respiratorie nel ricevente provocando la agglutinazione dei leucociti a livello dei vasi polmonari. Inoltre non è stato possibile seguire la cinetica anticorpale, in quanto la determinazione anticorpale, come da protocollo, è stata effettuata una sola volta: all'atto della valutazione della idoneità per i test MAG IgG e IgM e per il test SOR IgG e all'atto della donazione di plasma iperimmune per i test di Micro Neutralizzazione (MN). Sono stati selezionati per la donazione di plasma iperimmune solo soggetti che soddisfacevano i criteri di idoneità stabiliti dal DM 02/11/2015 e che erano risultati positivi ad entrambi i test per le IgG e negativi per le IgM anti SARS-CoV-2.

Nella nostra casistica, contrariamente a quanto riportato in letteratura, in una percentuale non trascurabile di soggetti, non era possibile evidenziare una risposta anticorpale. Infatti, considerando i test MAG IgG e IgM, questi erano entrambi negativi nel 14,1% dei casi mentre utilizzando il test SOR IgG, il 29,1% dei soggetti risultavano negativi (17-19). Questa osservazione assume particolare rilevanza considerando che tutti i soggetti erano stati sintomatici con temperatura che aveva superato i 37,5°C in associazione ad altri sintomi (Tabella I). Il tempo trascorso tra insorgenza della sintomatologia era compreso tra 45 e 120 giorni (mediana 68) appare adeguato allo sviluppo di una risposta immunitaria. Il ruolo della ricerca delle IgM nella diagnostica della infezione da SARS-CoV-2 è molto incerto (19) in quanto non sembrano comparire più precocemente delle IgG (17-19). Nella nostra casistica abbiamo osservato 10 soggetti con positività per sole IgM e in altri 32 le IgM erano presenti in associazione con le IgG. Il periodo tra esecuzione dello studio sierologico e data della diagnosi microbiologica era compreso tra 45 e 87 giorni (mediana 56) e non differiva significativamente ( $p=0,1$ ) da quello generale. Nessuno di questi soggetti risultava positivo alla ricerca di SARS-CoV-2 RNA circolante. I soggetti con positività per le IgM non sono stati considerati idonei alla donazione e quindi in questi soggetti non è stato eseguito il test di MN. Utilizzando il test SOR non era possibile evidenziare una produzione di IgG in una percentuale non trascurabile di soggetti, infatti il 13,2% presentava meno di 12 AU/mL e un altro 15,9% presentava tra 12 e 15 AU/mL.

Ai fini dell'arruolamento per la donazione di plasma iperimmune i soggetti presentanti <15 AU/mL sono stati considerati negativi al test IgG SOR.

Purtroppo, disponendo di una unica determinazione anticorpale non siamo stati in grado di valutare se questi soggetti abbiano sviluppato precocemente dopo la malattia una risposta anticorpale fugace e transitoria, non più rilevabile nel momento della esecuzione del test oppure realmente non siano stati in grado di generare una adeguata risposta anticorpale.

Nella nostra esperienza i test MAG e SOR hanno dimostrato una buona concordanza nell'individuare i soggetti con anticorpi IgG anti SARS-CoV-2 (IBC: 0,87,

K di Cohen 0,65). Tuttavia la risposta quantitativa appare assai poco confrontabile. Del resto i due test hanno diverso formato analitico e riconoscono differenti antigeni virali. Infatti il test MAG riconosce anticorpi diretti sia verso la proteina del nucleo capsida virale che verso la proteina delle spicole, mentre il test SOR riconosce anticorpi verso i determinanti S1 e S2 della proteina delle spicole virali (9,10). Inoltre entrambi i test riportano il risultato in unità arbitrarie (AU/mL) che non fanno quindi riferimento ad uno standard comune e presentano scale dimensionali assai differenti. Queste differenze possono giustificare il difforme comportamento osservato passando dal semplice giudizio qualitativo alla valutazione quantitativa confrontandoli con il test di MN che è, al momento, considerato il test di riferimento per lo studio della sierologia di SARS-CoV-2 (20-22). Queste osservazioni sono corroborate dalla rappresentazione dei valori quantitativi di IgG espressi in AU/mL per MAG IgG *versus* titolo in MN (figura 1) e per SOR IgG *versus* MN (figura 2). Considerando il test MAG, i valori mediani di concentrazione delle IgG erano assai ravvicinati per titoli di anticorpi neutralizzanti da 1/10 a 1/40, ed erano sovrapponibili per titoli di 1/160 e 1/320. Considerando invece il test SOR si osservava un progressivo e costante incremento della concentrazione di IgG rilevate all'aumentare del titolo di anticorpi neutralizzanti.

Sono stati infine valutati, mediante le curve ROC i valori soglia per i test MAG IgG e SOR IgG verso il titolo di anticorpi neutralizzanti a tre livelli: 1/80 come ammesso da FDA, 1/160 come raccomandato da ISS e 1/320 come raccomandato dalle linee guida Europee (4-6). I risultati ottenuti nel presente studio suggeriscono migliori prestazioni del test DiaSorin rispetto al test Maglumi quando comparati con il titolo di anticorpi neutralizzanti. Quindi riteniamo di poter confermare che esiste una buona correlazione tra la concentrazione anticorpale rilevata dal test SOR IgG ed espressa un AU/mL e il titolo neutralizzante determinato con il test della di micro neutralizzazione; i valori soglia ottenuti nel nostro studio sono in discreto accordo con quanto riportato in letteratura (10,23-26). Anche la analisi delle curve ROC ha permesso di confermare la presenza di una correlazione soddisfacente tra test SOR IgG e titolo di anticorpi neutralizzanti. Infatti per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/80 la AUC era 0,979 (IC 95% 0,90-0,99), il valore soglia si poneva a 85 AU/mL. Per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/160 la AUC era 0,966 (IC 95% 0,92-0,98), il valore soglia si poneva a 109 AU/mL. Per titoli di anticorpi neutralizzanti pari a 1/320 la AUC era 0,917 (IC 95% 0,86-0,96), il valore soglia si poneva a 144 AU/mL. Si tratta sempre di valori di AUC soddisfacenti.

Ferme restando le applicazioni dei test sierologici a fini epidemiologici e di tracciamento dei contatti (25,26) i dati riportati nel presente studio hanno dimostrato la loro utilità nell'evidenziare la siero conversione nei soggetti convalescenti e nel quantificare la risposta IgG al fine di selezionare dei pazienti/donatori in grado di fornire un plasma iperimmune con una concentrazione

anticorpale adeguata (titolo >1/80) da permetterne un adeguato uso clinico. Per questa applicazione il test di MN è ritenuto il gold standard (11-15); tuttavia è complesso e indaginoso, richiede molto tempo ed è disponibile solo in pochi Laboratori di riferimento. Pertanto non può essere utilizzato come primo approccio per la valutazione della idoneità per donatori di plasma iperimmune. Per questo scopo vengono utilizzati dei test quantitativi IgG che siano in grado di correlare con il titolo di anticorpi neutralizzanti. In questa specifica applicazione, il test SOR IgG sembra utilizzabile nella pratica clinica. Resta, a parere degli autori, la necessità di una migliore standardizzazione e armonizzazione dei test sierologici per SARS-CoV-2 e delle modalità di espressione dei risultati quantitativi (27).

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Chai K, Piechotta V, Kimber C et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst Rev* 2020 10:CD013600 doi: 10.1002/14651858.CD013600.pub3.
- Casadevall A, Joyner M, Pirofski L et al. A randomized trial of convalescent plasma for COVID-19: potentially hopeful signals. *JAMA* 2020;324:455-7.
- Duan K, Liu B, Li C et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Lancet Infect Dis* 2020;20:398-400.
- Studio TSUNAMI: Plasma da donatori guariti da COVID-19 Come terapia precoce per pazienti con polmonite da SARS-CoV2: studio multicentrico randomizzato controllato in aperto. [https://www.senato.it/application/xmanager/projects/leg18/attachments/documento\\_evento\\_procedura\\_commissione/files/000/214/701/BRUSAFERRO\\_4.pdf](https://www.senato.it/application/xmanager/projects/leg18/attachments/documento_evento_procedura_commissione/files/000/214/701/BRUSAFERRO_4.pdf). Ultimo accesso novembre 2020.
- US department of Health and Human Service Food and Drugs Administration. Investigational COVID-19 convalescent plasma: guidance for Industry. Rockville MD, FDA, 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/investigational-covid-19-convalescent-plasma>. Ultimo accesso novembre 2020.
- An EU programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion. Ref. Ares(2020) 1993684 - 08/04/2020. [https://www.notifylibrary.org/sites/default/files/guidance\\_plasma\\_covid19\\_en.pdf](https://www.notifylibrary.org/sites/default/files/guidance_plasma_covid19_en.pdf). Ultimo accesso: novembre 2020.
- Mancini F, Barbanti F, Scaturro M et al. Laboratory management for SARS-CoV-2 detection: a user-friendly combination of the heat treatment approach and rt-Real-time PCR testing. *Emerg Microb Infect* 2020;9:1393-6.
- Vogels C, Brito A, Wyllie A et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol* 2020;5:1299-305.
- Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L et al. Analytical performance of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1081-8.
- Bonelli F, Sarasini A, Zierold C et al. Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2 neutralizing IgG in COVID-19 patients semiquantitatively. *J Clin Microbiol* 2020;58:1224-30.
- Jaaskelainen A, Kuivanen S, Kekalainen et al. Performance of six SARS-CoV-2 immunoassays in comparison with microneutralisation. *J Clin Virology* 2020 DOI 10.1016/j.jcv.2020.104512.
- Legros V, Denolly S, Vogrig M et al. A longitudinal study of SARS-CoV-2 infected patients shows high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell Mol Immunol* 2021. doi: 10.1038/s41423-020-00588-2.
- Manenti A, Maggetti M, Casa E et al. Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a CPE-based colorimetric live virus micro-neutralization assay in human serum samples. *J Med Virol* doi: 10.1002/jmv.25986.
- Deshpande G R, Sapkal G N, Bipin N et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Indian J Med Res* 2020;152:82-87. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_2382\_20.
- Park J, Oladunni F, Chiem K et al. Rapid in vitro assays for screening neutralizing antibodies and antivirals against SARS CoV 2. *J Virol Meth* 2020; doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113995.
- D'Arrigo G, Provenzano F, Torino C. I test diagnostici e l'analisi della curva ROC. *G. Ital Nefrol* 2011;28: 642-7.
- Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescent immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0473.
- Quan-Xin L, Bai-Zhong L, Hai-Jun D et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:845-8.
- Kohmer N, Westhaus S, Ruhl C et al. Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests. *Med Virol* 2020 DOI 10.1002/jmv.26145.
- Kohmer N, Westhaus S, Ruhl C et al. Brief clinical evaluation of six high throughput SARS-CoV-2 IgG antibody. *J Clin Virol* 2020 DOI 10.1016/j.jcv.2020.104480
- Dittadi R, Afshar H, Carraro P. The early antibody response to SARS-Cov-2 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:201-3.
- Lee W, Girardin R, Dupuis A et al. Neutralizing antibody responses in COVID-19 convalescent sera. *J infect Dis* 2020 doi:10.1093/infdis/jiaa673.
- Van Kessel C, Okba N, Igloi A et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat Comm* 2020 doi: 10.1038/s41467.020.17317.
- Abe K, Li Z, Sampson R et al. A simple protein based surrogate neutralization assay for SARS CoV-2. *JCI Insight* 2020; 5:e142362.
- Istituto Superiore di Sanità. Test di laboratorio per SARS-CoV-2 e loro uso in sanità pubblica. 23 Ottobre 2020. [https://www.iss.it/altre-pubblicazioni/-/asset\\_publisher/btw1J82wtYzH/content/nota-tecnica-ad-interim-test-di-laboratorio-per-sars-cov-2-e-loro-uso-in-sanita-25C3%25A0-pubblica.-aggiornata-al-23-ottobre-2020](https://www.iss.it/altre-pubblicazioni/-/asset_publisher/btw1J82wtYzH/content/nota-tecnica-ad-interim-test-di-laboratorio-per-sars-cov-2-e-loro-uso-in-sanita-25C3%25A0-pubblica.-aggiornata-al-23-ottobre-2020). Ultimo accesso: novembre 2020.
- Ying-Hui J, Cai L, Zhen-Shun C et al. A rapid advice guidelines for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia. *Mil MedRes* 2020 doi: 10.1186/s40779-020-0233-6.
- Plebani M, Padoan A, Negrini D et al. Diagnostic performance and thresholds: the key to harmonization in serological SARS-CoV-e assays? *Clin Chim Acta* 2020 doi: 10.1016/J.cca.2020.05.050.

## Antibody identification in COVID-19 pandemic: a comparison between immunochemiluminescence and immunochromatography methods

Ruggero Buonocore<sup>1</sup>, Matteo Vidali<sup>1</sup>, Marco Cusini<sup>2</sup>, Paola De Corato<sup>1</sup>, Carmine Melchionna<sup>1</sup>, Eleonora Galbiati<sup>1</sup>, Emilio Berti<sup>2</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, 20122 Milano

<sup>2</sup>UOC Dermatologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, 20122 Milano

### ABSTRACT

**Introduction:** in the fight against the COVID-19 pandemic, the determination of the serum antibodies against SARS-CoV-2 is highly relevant, although the reliability of the results delivered is sometimes questionable. The aim of this paper is to evaluate the performances of a rapid immunochromatography test for IgG and IgM antibodies, comparing them with an immunochemiluminescence method.

**Methods:** we analyzed 357 sera for the presence of IgG anti-SARS-CoV-2 spike proteins S1/S2 with an automated immunochemiluminescent test (DiaSorin<sup>®</sup>) and the presence of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein with an immunochromatography method (LEPU<sup>®</sup>) based on lateral flow technology.

**Results:** with Diasorin<sup>®</sup> method, 248 subjects resulted to be negative and 109 positives, whereas LEPU<sup>®</sup> test was positive (IgM+ and/or IgG+) in 98 subjects. The overall concordance between LEPU<sup>®</sup> and DiaSorin<sup>®</sup>, was 94.1% (95% CI 91.0-96.2). Cohen's kappa was 0.86 (95% CI 0.80-0.92), indicating good agreement. 21 out of 357 (5.9%) samples had a discordant result and were re-analyzed with a third method (Roche Diagnostics Electrochemiluminescence<sup>®</sup>): 4 out of 5 DiaSorin<sup>®</sup> negative/LEPU<sup>®</sup> positive samples were confirmed as negative by Roche<sup>®</sup>; conversely, among the 16 DiaSorin<sup>®</sup> positive/LEPU<sup>®</sup> negative samples, 5 were confirmed as positive by Roche<sup>®</sup>, 6 as negative and 5 were not retested due to insufficient sample volume.

**Conclusions:** despite the methods were designed to detect different antibodies an overall high agreement between techniques was found. Discrepant results were found and were likely due to different antigen targets recognized by methods. The observation that only 6 out of 11 DiaSorin<sup>®</sup> positive samples were not confirmed by ROCHE<sup>®</sup>, supports the antigen-dependent hypothesis.

### INTRODUCTION

With 63.5 million of cases, COrona Virus Disease – 19 (COVID-19) represents a dramatic emergency worldwide that highlights the urgent need for solid clinical and laboratory biomarkers to help physicians for an adequate patient's management (1). 80-85 % of patients show no or just mild respiratory symptoms; 15-20% of infected patients have more severe forms of the disease and display major clinical respiratory complications that frequently evolve in multi organ disfunction, especially if comorbidities (i.e. diabetes, hypertension, coronary heart disease, etc.) are present (2–4).

Diagnosis is based upon the detection of viral RNA

through Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in samples from upper or lower respiratory tract. Although RT-PCR requires high technical skills and automated technologies, it provides the current gold standard in SARS-CoV-2 infection detection. Several preanalytical variables, such as the time of specimen collection, are pivotal for a correct viral RNA extraction and quantification (5–8). In the upper respiratory tract, viral RNA titer reaches a maximum concentration within 7-10 days after symptoms onset and then steadily declines in the following days. RNA in lower respiratory tract is still present after 3 weeks from symptoms onset (6,9–11).

Antibody anti-SARS-CoV-2 determination could be

Corrispondenza a: Ruggero Buonocore, Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Francesco Sforza 28, 20122 Milano, Italy, Tel +39 3403284928, E-mail ruggero.buonocore@policlinico.mi.it

Ricevuto: 18.01.2021

Revisionato: 23.02.2021

Accettato: 26.02.2021

Pubblicato on-line: 12.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.016

another valuable tool in the pandemic surveillance. SARS-CoV-2 displays a singular antigenicity. In Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS) and also SARS-CoV-2, both IgM and IgG antibody levels are detectable simultaneously after 2-3 weeks from symptoms onset (9). However, in mild and asymptomatic patients the antibody determination may give a false negative result, causing the impossibility to identify potential contagious individuals (9,12–16).

SARS-CoV-2 expresses four major structural proteins named Spike (S), Envelope (E), Membrane (M) and Nucleocapsid (N) protein (2). S protein is composed by 2 subunits known as Spike 1 (S1), which binds the virus to human angiotensin-converting-enzyme-2 (ACE-2), and Spike 2 (S2) which permits the entrance of SARS-CoV-2 in the patient's cells. N protein instead is important for the viral pathogenicity, replication and RNA packing. S protein and N protein seem to represent the prevalent targets of immune response. Nowadays, the scientific community is still arguing regarding which antibody could be the most efficient in neutralizing the virus activity. The S protein might be the most representative target, since many *in vitro* assays demonstrated that IgG and IgM toward S proteins could block the viral infectivity and may be used as vaccine against SARS-CoV-2 (2,9,17).

The most used technologies for anti-SARS-CoV-2 antibodies detection are based on enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), chemiluminescence (CLIA) and immunochromatography. Despite the more reliable performance of ELISA and CLIA in comparison to immunochromatography, this method still may represent a useful option as a Point Of Care Testing (POCT), which enables a rapid identification of anti SARS-CoV-2 antibodies. Indeed, the interest in POCT anti-SARS-CoV-2 antibody detection is growing and it is explained by the availability of immediate result compared with RT-PCR, ELISA and CLIA (6,18,19). However variable analytical performances, demonstrated by different authors in SARS-CoV-2 antibodies identification using POCT, raise doubts regarding their sensitivity and specificity to identify true positive patients (6,19,20). The aim of our study was to evaluate the agreement between an immunochromatography POCT system (LEPU®) and an automated CLIA platform.

## METHODS

### Patients

357 sera of health-care workers from Ospedale Maggiore Policlinico in Milan were analyzed for presence of antibody anti-SARS-CoV-2. The collection was part of a large screening program aiming to define the prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the hospital health care workers population. All samples were anonymized before the analysis.

### Sample preparation

Samples were collected using Serum Sep Clot Activator (VACUETTE-Greiner Bio-one®) and kept at room temperature for 30 minutes to allow the clot formation. All specimens were centrifuged at 3500 rpm for 8 minutes and divided in two aliquots: one was immediately tested with an automated immunochemiluminescent assay (DiaSorin® Saluggia, Italy), while the other one was stored at -20 °C and tested afterward with lateral flow immunochromatography (LEPU® Technology, Beijing Lepu Medical Technology Co., China). 21 samples, that resulted discordant with the two previous techniques, were reanalyzed in the same day of tawing with a third method using the second aliquot (Elecsys Anti-SARS-CoV-2, Roche®).

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki as amended in 2013, under the terms of all relevant local legislation; all participants subscribed an informed consent.

### Analytical methods

#### *Lateral flow immunochromatography assay*

LEPU® Technology lateral flow immunochromatography (Beijing, China, lot: 20CG2505X) is a rapid lateral flow immunoassay for anti-SARS-CoV-2 antibody detection against Nucleocapsid proteins, based on the principle of antigen-antibody reaction and immunoassay technique. The test uses a nitrocellulose membrane coated with SARS-CoV-2 colloidal gold labeled recombinant protein, a mouse-anti human IgG and IgM immobilized in G and M test area respectively and a corresponding antibody in the quality control area. 10 µL of serum and 80 µL of sample dilution buffer, are added in two dedicated wells. The sample migrates upward through capillary effect. When SARS-CoV-2 IgG and/or IgM antibodies were at or above the limit of detection of the method, they bind the colloidal labeled SARS-CoV-2 recombinant protein on a gold labeled pad. Subsequently the antigen-antibody complex is captured by mouse-anti-human IgG and/or IgM antibodies immobilized in G or M area and produce a purple-red band. In samples with an antibody content below the limit of detection of the method, no purple-red band appears in IgG and/or IgM test area. Regardless of the presence or absence of antibodies in patient's sample, a purple-red band must appear in the control area to validate the test. The result must be read within 10-20 minutes as indicated by the producer.

#### *Automated immunochemiluminescent assay*

LIAISON® SARS-CoV-2 (DiaSorin®, Saluggia, Italy, Ref 311450, Lot 354029), is based on an indirect immuno-chemiluminescence full-automated technology for the quantification of IgG antibody anti-Spike1 (anti-S1) and anti-Spike2 (anti-S2) against SARS-CoV-2. Recombinant antigens Spike1 (S1) and Spike2 (S2) of

**Tabel 1**

Cross-tabulation of antibody detection by DiaSorin and LEPU tests (number of samples).

		DiaSorin		
		Positive	Negative	Total
LEPU	Positive	93	5	98
	Negative	16	243	259
	Total	109	248	357

**Tabel 2**

Level of agreement between LEPU and DiaSorin methods.

Concordance	94.1% (95% CI 91.0-96.2)
Specific Positive Agreement	89.9% (95% CI 85.3-93.9)
Specific Negative Agreement	95.9% (95% CI 94.0-97.5)
Cohen's Kappa	0.86 (95% CI 0.80-0.92)

95% CI, 95% Confidence Interval.

SARS-CoV-2 are immobilized on dedicated magnetic beads (solid phase) while mouse monoclonal antibodies anti-human IgG are bound with isoluminol. During first incubation, the IgG anti-SARS-CoV-2 present in the samples and in controls recognize S1 and S2 antigens present on solid phase. All the unbound IgG are removed with a first washing cycle. During the second incubation the antibodies conjugated with isoluminol react with IgG anti-SARS-CoV-2 and a second wash cycle is performed to eliminate the exceeding amount of antibodies. A dedicated substrate is added to the solution and induces a chemiluminescence reaction produced with an intensity proportional to concentration of IgG anti-SARS-CoV-2 present in the patient's serum. The results are available within 30 minutes. The cut-off limit for a positive sample is  $\geq 15$  AU/mL (Arbitrary Units/mL), while the cut-off value for a negative sample is  $\leq 12$  AU/mL. Dubious samples have a concentration between 12-15 AU/mL. In these cases, the producer recommends to run the sample a second time and if the result is confirmed, a new two weeks later is recommended.

**Qualitative electrochemiluminescence immune assay**

Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche®, Mannheim, Germany Ref 09203079190, Lot 520916,) is a qualitative electrochemiluminescence immune assay based on the principle of sandwich antigens method, which includes recombinant proteins of SARS-CoV-2 Nucleocapsid to reveal the presence of IgG, IgA and/or IgM anti-SARS-

CoV-2 antibody in the patient's serum. During the first incubation, 12  $\mu$ L of serum are mixed together with a recombinant biotinylated SARS-CoV-2 antigen and with a second recombinant ruthenium labeled SARS-CoV-2 antigen to allow the sandwich complex formation. The second incubation involves dedicated microparticles coated with streptavidin, which enable the binding of the complexes to the solid phase. After a washing cycle, a specific electrode allows the chemiluminescence reaction which displays an intensity proportional to the antibody's concentration in the sample. The results are available within 18 minutes. The suggested cut-off for a positive sample is 1.0 ICO (Index of Cut Off).

**Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by SPSS statistical software v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R Language v.4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Categorical variables were reported as absolute and relative frequencies. The overall agreement was calculated as percentage of concordant pairs [(DP+DN)/total pairs], while positive or negative agreement were calculated as specific positive or negative agreement, respectively [2DP/(2DP+SP1+SP2)] or [2DN/(2DN+SP1+SP2)], where DP, DN, SP1, SP2 indicate respectively patients positive (DP) or negative (DN) to both tests, SP1 and SP2 patients positive only to a single test. 95% confidence intervals (95%CI) for the overall and specific agreements were calculated respectively by the Wilson Score or bootstrap methods. The overall agreement was also reported by Cohen's kappa with its 95 % CI.

**RESULTS**

With DiaSorin® 248 (69.5%) subjects were negative and 109 (30.5%) positive, whereas LEPU® test was positive (IgM+ and/or IgG+) in 98 (27.5%) subjects. In particular, 6 patients (1.7%) were positive only for IgM, 42 (11.8%) for IgG and 50 (14.0%) displayed both IgM and IgG positivity. 21 out of 357 (5.9%) samples showed discordant results, with 16 (4.5%) subjects detected only by DiaSorin®, while 5 (1.4%) only by LEPU test (Table 1). The overall concordance between LEPU and DiaSorin®,

calculated as concordant pairs, was 94.1% (95%CI 91.0-96.2), with proportions of specific positive and negative agreement respectively of 89.9% (95%CI 85.3-93.9) and 95.9% (95%CI 94.0-97.5). Cohen's kappa was 0.86 (95% CI 0.80-0.92), indicating good agreements (Table 2). All but 5 discordant samples were re-analyzed with a third method (Total Ig anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein - Roche® Diagnostics): 4 out of 5 DiaSorin® negative/LEPU positive samples were confirmed as negative by Roche; conversely, among the 16 DiaSorin® positive/LEPU® negative samples, 5 were confirmed as positive by Roche®, 6 as negative and 5 were not retested due to insufficient sample volume.

## DISCUSSION

Immunodiagnostic POCT could be a particular useful tool in SARS-CoV-2 antibody determination since it requires low sample amount and it could be performed at patient's bedside or home. Moreover, the application of immunodiagnostic methods could be a pivotal strategy to spot new outbreaks thus ensuring a safer management of public health security. They give the opportunity to detect asymptomatic patients, who are not tested for viral RNA presence, to evaluate the COVID-19 spread in the population for epidemiological purposes, to plan a successful vaccination campaign and to identify subjects with post-vaccine antibody titres.

An important aspect is related to the kinetics of antibodies appearing in patients' serum. Currently, few evidences are available on the correct timing for SARS-CoV-2 antibody screening, since immunological response displays high variability both in intensity and isotype (IgM and IgG) appearance.

Guo et al. reported that the median time of IgM and IgA appearance in serum is about 3-6 days from the beginning of symptoms, while IgG show a median appearance between 10-18 days (2,19). This is in contrast with other authors who claimed that IgG and IgM in SARS-CoV-2 infection have a similar onset time (9,12-16). The difficulty to standardize the time of collection may be an explanation of antibody detection discrepancy among different methods. If the sample is collected too early, IgG and/or IgM will likely be below the method sensitivity and thus not detectable. On the opposite, if the collection is delayed, it is possible to find only IgG or low IgM levels.

In this study, an overall high agreement between methods was found, with DiaSorin® showing a slightly higher (30.5%) antibody prevalence than LEPU® POCT technology (27.5% - IgG or IgM or both). Such a high agreement was not expected, when considering that the methods employed in this study were designed to detect different targets of SARS-CoV-2 (N versus S1/S2 antigen), as well as different Ig classes (IgM/IgG versus IgG only). These results seem to suggest that SARS-CoV-2 may elicit in the same patient an antibody response towards multiple viral targets. Titers of different antibodies (anti-N or anti-S1/S2) may decrease with

different kinetics, possibly becoming soon undetectable in some patients, hence explaining different prevalences, as those found also in this study. Another element which could explain the lower prevalence found with LEPU® POCT compared to DiaSorin®, is the subjective interpretation of the signal bands. Indeed, a weak positive band could be misidentified, particularly with hemolyzed samples, where the weak signal may be hidden by the pink background of sample migrating in the POCT pad.

Few discrepant results (n=21) between methods were found and were likely due to the causes reported above. In particular, the observation that 6 out of 11 DiaSorin® positive samples were not confirmed by Roche®, which uses the same antigen target as LEPU® Technology, supports the hypothesis that method discrepancies were related to different antigen targets.

High concordance between qualitative tests often relies on samples with a huge difference between frequencies of positive and negative cases (few positive cases and many negative cases). This was not the case for the high agreement between LEPU® and DiaSorin® (94.1%), as also suggested by both elevated positive (89.9%) and negative (95.9%) specific agreement.

All these results suggest that LEPU® Technology can be considered a valid POCT screening test.

A possible limitation of this study is that LEPU® technology has been tested with serum samples and not with capillary blood samples as in drive-in, home or bedside settings. In these situations, a lower agreement could be assumed, due to different factors (e.g. less trained operators, more subjective band interpretation).

In conclusion, rapid tests are an interesting diagnostic solution and could play an essential role for the whole community in the fight against SARS-CoV-2.

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## REFERENCES

1. Henry BM, De Oliveira MHS, Benoit S, et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1021-8.
2. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomed* 2020;91:137-45.
3. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020;323:1239-42.
4. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054-62.
5. Stowell SR, Guarner J. Role of serology in the coronavirus disease 2019 pandemic. *Clin Infect Dis* 2020;71:1935-6.

6. Russo A, Minichini C, Starace M, et al. Current status of laboratory diagnosis for covid-19: A narrative review. *Infect Drug Resist* 2020;13:2657–65.
7. Technical guidance publications n.d. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance-publications> (last accessed December 2020).
8. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1070–6.
9. Van Caeselele P, Bailey D, Forgie SE, et al. SARS-CoV-2 (COVID-19) serology: Implications for clinical practice, laboratory medicine and public health. *CMAJ* 2020;192:E973–9.
10. Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS. False negative tests for SARS-CoV-2 infection - Challenges and Implications. *N Engl J Med* 2020;383:e38.
11. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020;20:565–74.
12. Sun B, Feng Y, Mo X, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:940–8.
13. Zhang G, Nie S, Zhang Z, et al. Longitudinal change of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *J Infect Dis* 2020;222:183–8.
14. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing | CDC n.d. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html> (last accessed December 2020).
15. Yongchen Z, Shen H, Wang X, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:833–6.
16. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:845–8.
17. Lu H, Stratton CW, Tang YW. An evolving approach to the laboratory assessment of COVID-19. *J Med Virol* 2020;92:1812–7.
18. Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics* 2020 doi:10.3390/diagnostics10040202.
19. Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020;71:778–85.

## Modalità di refertazione del D-Dimero e prestazioni dei sistemi analitici: quali informazioni dal programma di Valutazione Esterna di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica

Sandra Secchiero<sup>1</sup>, Laura Sciacovelli<sup>1</sup>, Mario Plebani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università, Padova, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università, Padova, Italia

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, quale Comunicazione Orale*

### ABSTRACT

#### Reporting of D-Dimer and performance of analytical systems: data from participants to the External Quality Assessment Scheme of the Biomedical Research Centre in Italy.

**Introduction:** D-Dimer assessment represents a cornerstone in the diagnostic approach to several thrombotic disorders. Recent literature has highlighted the role of D-Dimer also in the diagnostic pathway of coronavirus infection (COVID-19) and the importance of harmonized reporting [D-dimer unit (DDU) or fibrinogen equivalent unit (FEU); unit of measure; cut-off] in order to guarantee the correct interpretation of the results.

**Methods:** D-Dimer data from 100 EQA participants and the inter-laboratory variability (CV%) of the last 7 years for the most used analytical systems: Werfen, HemosIL HS; Werfen, HemosIL HS-500; Auto D-D, Sclavo; Innovance, Siemens; VIDAS, bioMérieux and STA Liatest, Stago have been evaluated.

**Results:** concerning the results expression in DDU or FEU, we observed a prevalence of FEU (55.1%) over DDU (44.9%); the value was confirmed in the last 7 years (average FEU = 55.6%), differently from data obtained in the survey conducted in 2014 at a national level.

The units used are: ng/mL (67.8%), µg/L (29.0%) and mg/L (3.2%) for D-Dimer DDU; ng/mL (57.9%), µg/mL (21.0%), µg/L (15.8%) and mg/L (5.3%) for D-Dimer FEU.

Inter-laboratory variability (mean CV%) calculated on a total of 72 controls is lower for all diagnostic systems at pathological levels than the one observed for concentrations below the cut-off.

**Discussion:** this study demonstrates that the reporting of D-Dimer results does not comply with the 2014 SIBioC consensus document which recommended the use of µg/L FEU, and highlights 8 different types of information. Data reported in this study call for the harmonization of D-Dimer reporting in order to guarantee the correct interpretation of the information, both in the case of COVID-19 and in all the diseases already known where this analyte has a clinical relevance.

### INTRODUZIONE

La determinazione del D-dimero, congiuntamente all'utilizzo di "score" clinici e alla diagnostica per immagini, rappresenta un cardine nell'approccio diagnostico a molti disordini della coagulazione quali la trombosi venosa profonda e l'embolia polmonare, la coagulazione intravascolare disseminata, le trombosi retiniche e altre patologie trombotiche (1). La recente letteratura ha messo in luce il ruolo del D-dimero anche nel processo diagnostico e prognostico di COVID-19.

Tra i parametri di laboratorio più rilevanti per seguire l'evoluzione della coagulopatia presente nei pazienti affetti da COVID-19, infatti, quelli che risultano di particolare utilità sono il conteggio piastrinico, il tempo di protrombina e il D-dimero. Quest'ultimo, come riportato in molti studi, è il parametro che correla meglio con l'evoluzione clinica del paziente (2-7).

Purtroppo la determinazione del D-dimero presenta una serie di problematiche relative sia alla fase pre-analitica, sia a quella analitica nonché alla fase post-analitica (8,9).

Corrispondenza a: Sandra Secchiero, Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, c/o UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Nicolò Giustiniani 2, 35128 Padova, Tel 049 8214491, E-mail sandra.secchiero@aopd.veneto.it

Ricevuto: 11.02.2021

Revisionato: 27.02.2021

Accettato: 08.03.2021

Pubblicato on-line: 14.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.018

Relativamente alla fase pre-analitica le maggiori criticità si riscontrano nella scelta della matrice biologica (plasma raccolto in EDTA, eparina, sodio citrato o sangue intero raccolto in sodio citrato) e nella valutazione della qualità del campione raccolto: presenza di emolisi o coaguli, inadeguato rapporto tra sangue e anticoagulante (9).

Le problematiche analitiche possono essere legate all'eterogeneità molecolare dell'analita, all'assenza di un materiale di riferimento, alla scelta del calibratore e al tipo di anticorpi monoclonali utilizzati dal produttore.

Il D-dimero rappresenta una piccolissima quota dei diversi prodotti di degradazione della fibrina stabilizzata derivati dall'azione combinata di 3 enzimi: la trombina, il fattore XIII attivato e la plasmina. Non è quindi una singola molecola ma piuttosto una miscela di peptidi (DDE, YD/DY, YY/DXD) caratterizzati dalla presenza del dimero D il quale può avere una diversa immunoreattività per l'anticorpo utilizzato; inoltre i prodotti di degradazione possono complessarsi tra loro limitando l'accessibilità degli epitopi verso cui gli anticorpi sono diretti. Questa spiccata eterogeneità del D-dimero ha rappresentato un grosso ostacolo nel processo di standardizzazione dato che i calibratori dei differenti metodi e i materiali di controllo differiscono considerevolmente tanto da rendere ogni risultato "metodo specifico".

Dal 1997 sono stati intrapresi vari tentativi di standardizzazione utilizzando materiali diversi (D-dimero purificato, plasma di pazienti con coagulazione intravascolare disseminata), ma nessuno di questi materiali ha permesso la standardizzazione dei vari metodi commerciali (10-15).

Il metodo che è stato a lungo considerato il "gold standard" è il metodo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) su micropiastra, largamente utilizzato prima dell'avvento dei metodi di agglutinazione al lattice, principalmente per scopi di ricerca, poiché richiede manualità e competenze tecniche e ha un tempo di risposta (TAT) molto elevato (circa 2-4 ore).

Il metodo ancor oggi considerato di riferimento è un metodo ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), sviluppato a metà degli anni 90 da BioMerièux, che presenta sensibilità e specificità simili al metodo ELISA su micropiastra ma con il grande vantaggio di essere automatizzato e quindi con un TAT molto ridotto (30 minuti).

Successivamente, sono stati sviluppati metodi chemiluminescenti e immunoturbidimetrici che utilizzano particelle al lattice; questi ultimi, impiegati da molti sistemi analitici, presentano un'alta sensibilità ma una moderata specificità. Gli anticorpi (Ab) monoclonali utilizzati nei vari metodi hanno una diversa reattività verso i diversi prodotti di degradazione della fibrina stabilizzata, in funzione della diversa esposizione degli epitopi; conseguentemente lo stesso Ab monoclonale può reagire diversamente con frammenti diversi e lo stesso frammento può reagire diversamente con differenti Ab monoclonali (16).

La scelta del calibratore da parte del produttore è complessa, poiché difficilmente essa rifletterà

l'eterogeneità dei prodotti di degradazione. Vi sono due possibili tipi di calibratore: il D-dimero purificato (con risultati in unità D-Dimero, DDU a 195 kDa) e la fibrina stabilizzata digerita con plasmina (con risultati in unità di fibrinogeno equivalenti, FEU a 340 kDa). Quindi il risultato del D-Dimero può essere espresso in relazione alla calibrazione dei singoli metodi in DDU o in FEU; dove  $FEU = 2 DDU$  (17,18).

Relativamente alla fase post-analitica ci sono diversi elementi a corredo del valore numerico, necessari per una corretta interpretazione; questi, se male utilizzati, possono dar luogo a confusione e possibili disinformazioni. Favaloro et al. hanno esaminato 21 lavori della recente letteratura ed è emerso che solo 3 riportavano il metodo utilizzato, in nessun lavoro, ad eccezione di uno, veniva specificato se il risultato era espresso in DDU o FEU; solo il 50% dei lavori riportava il livello decisionale; 2 non riportavano le unità di misura e 3 lavori riportavano unità sbagliate (19). Per esempio il lavoro di Wang et al., riporta i risultati del D-dimero in mg/L ma evidentemente sono valori riferiti a  $\mu\text{g/L}$ , dato che risultano 1000 volte superiori a quelli attesi (20); viceversa, i lavori di Gao et al. e Guo et al. riportano i valori in  $\mu\text{g/L}$ , ma risultano 1000 volte inferiori a quelli attesi (21,22).

Questa rassegna ci ha stimolato a valutare i dati relativi alla determinazione del D-dimero, in termini di espressione dei risultati, unità di misura e livelli decisionali, utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB, Azienda Ospedale-Università, Padova). Inoltre abbiamo studiato la variabilità interlaboratorio dei sistemi analitici maggiormente utilizzati, riscontrata negli ultimi 7 cicli di VEQ.

## METODI

Sono stati esaminati i dati relativi al D-dimero di 100 partecipanti al programma di VEQ per la coagulazione del CRB, in termini di espressione dei risultati, unità di misura e livelli decisionali. Ciò è reso possibile dal fatto che, per tutti i programmi di VEQ, la raccolta dei dati avviene mediante il sito web del CRB che permette al laboratorio di inserire i risultati e gli intervalli di riferimento (IR) o, nel caso del D-dimero, i livelli decisionali con le stesse modalità e unità di misura utilizzate per comunicare i risultati al clinico.

Inoltre è stata analizzata la variabilità analitica (CV%) dei sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti, riscontrata per 4 livelli di concentrazione, su un totale di 72 campioni di controllo distribuiti negli ultimi 7 cicli di VEQ. Ogni ciclo di VEQ prevede l'analisi di 8 campioni, suddivisi in 4 esercizi.

I campioni di controllo sono costituiti da plasma liofilizzato, ottenuto da un pool di plasmi umani di donatori sani raccolti in citrato trisodico al 3,2%, opportunamente stabilizzato e liofilizzato. I plasmi con valori patologici sono ottenuti con un particolare procedimento di adsorbimento, per regolare l'attività dei fattori coagulativi a valori appropriati per riprodurre valori

Tabella 1

Caratteristiche dei sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti alla VEQ.

	VIDAS, BioMérieux	STALiatest D-Di, Stago	Innovance, Siemens	HemosIL D-dimer HS, Werfen	HemosIL D-dimer HS 500, Werfen	Auto D-Dimero, Sclavo
<b>Strumento</b>		STA	Sysmex CA-1500	ACL TOP	ACL TOP	Sysmex CS-2100
<b>Metodo</b>	ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice
<b>Materiale antigenico per la calibrazione</b>	Prodotti di degradazione della fibrina	D-dimero purificato	Prodotti di degradazione della fibrina	D-dimero purificato	Prodotti di degradazione della fibrina	D-dimero purificato
<b>Limite di rivelabilità</b>	45 ng/mL, FEU	0,22 µg/mL, DDU	0,17 mg/L, FEU	69 ng/mL, DDU	146 ng/mL, FEU	50 ng/mL, DDU
<b>Intervallo di misura</b>	45 -10000 ng/mL, FEU	0,22 - 4,00 µg/mL, DDU 0,22 - 20,0 µg/mL, FEU	0,19 - 35,20 mg/L, FEU	150 - 3680 ng/mL, DDU	359 -7650 ng/mL, FEU	50 - 3500 ng/mL, DDU
<b>Sensibilità</b>	100% (82,0-100%)	100% (95,8-100%)	99% (97,0-99,0%)	100% (95,4 -100%)	100% (96,0-100%)	100% (93,3-100%)
<b>Specificità</b>	42% (37-46%)	55,2% (51,9-58,5%)	40% (38-40%)	46,8% (40,1-53,6%)	42,1% (36,6-47,8%)	69,2% (63,3-74,7%)
<b>Valore Predittivo negativo</b>	100%	100% (99,3-100%)	99,5%	100% (95,5-100%)	100% (97,2-100%)	100% (98-100%)
<b>Valore decisionale</b>	500 ng/mL, FEU	0,5 µg/mL, FEU	0,5 mg/L, FEU	250 ng/mL, DDU 500 ng/mL, FEU	500 ng/mL, FEU	200 ng/mL, DDU

DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

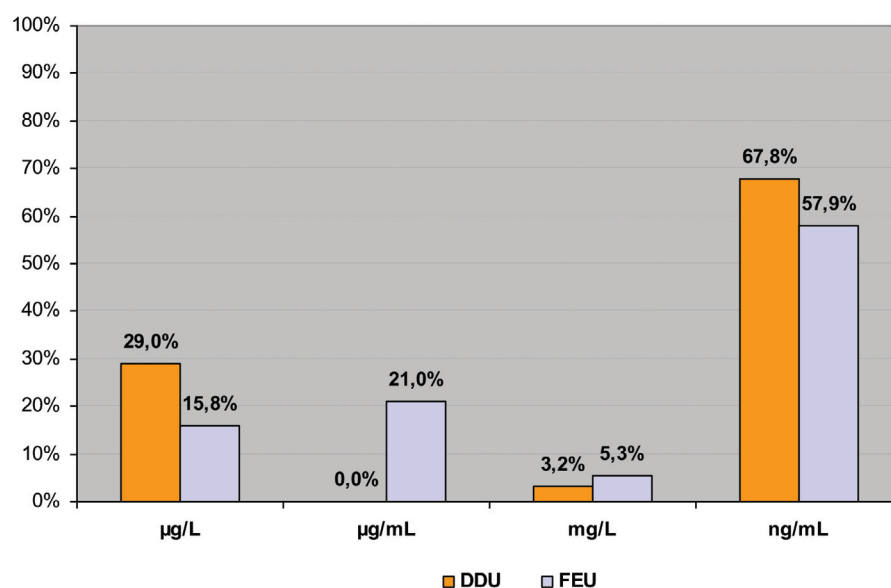


Figura 1

Unità di misura utilizzate dai partecipanti al programma di VEQ del CRB per la refertazione del D-dimero. CRB, Centro di Ricerca Biomedica; DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

di plasmi patologici o di pazienti in terapia. I campioni di controllo sono spediti ai singoli laboratori partecipanti al programma di VEQ a due a due per un totale di 5 spedizioni/anno.

I sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti nei cicli 2014-2020 sono i seguenti: HemosIL HS, Werfen (n = 36, min 19 - max 48), HemosIL HS-500, Werfen (n = 8, min 7 - max 9), Auto D-D, Sclavo (n = 12, min 7 - max 19), Innovance, Siemens (n = 14, min 7 - max 19), VIDAS, BioMérieux (n = 10, min 7 - max 18) e STALiatest, Stago (n = 9, min 7 - max 15). Sono tutti metodi immunoturbidimetrici che utilizzano particelle di lattice rivestite di Ab monoclonali ad eccezione di VIDAS che permette la determinazione immunoenzimatica dei prodotti di degradazione della fibrina nel plasma umano con la tecnica ELFA. In Tabella 1 sono riportate le relative caratteristiche con dati ricavati dalla letteratura (23-29).

I Programmi di VEQ del CRB raccolgono (in modo facoltativo) gli IR adottati dai laboratori partecipanti. Ad ogni ciclo di VEQ viene pubblicato un report con una rappresentazione grafica che mette in relazione i risultati di tutti i partecipanti, ottenuti dalla determinazione di un campione di controllo, con i rispettivi IR dichiarati. Per rendere confrontabili gli IR si chiede ai partecipanti di indicare quello riferito ad un maschio in età adulta (30).

## Analisi statistica

Per l'analisi della variabilità analitica intra-metodo (CV% medio) sono stati utilizzati, per ogni campione, i CV% medi di ciascun sistema analitico con numerosità di risultati >7, considerando solo i valori superiori al limite di rilevabilità indicato dal produttore.

## RISULTATI

### Espressione dei risultati e unità di misura

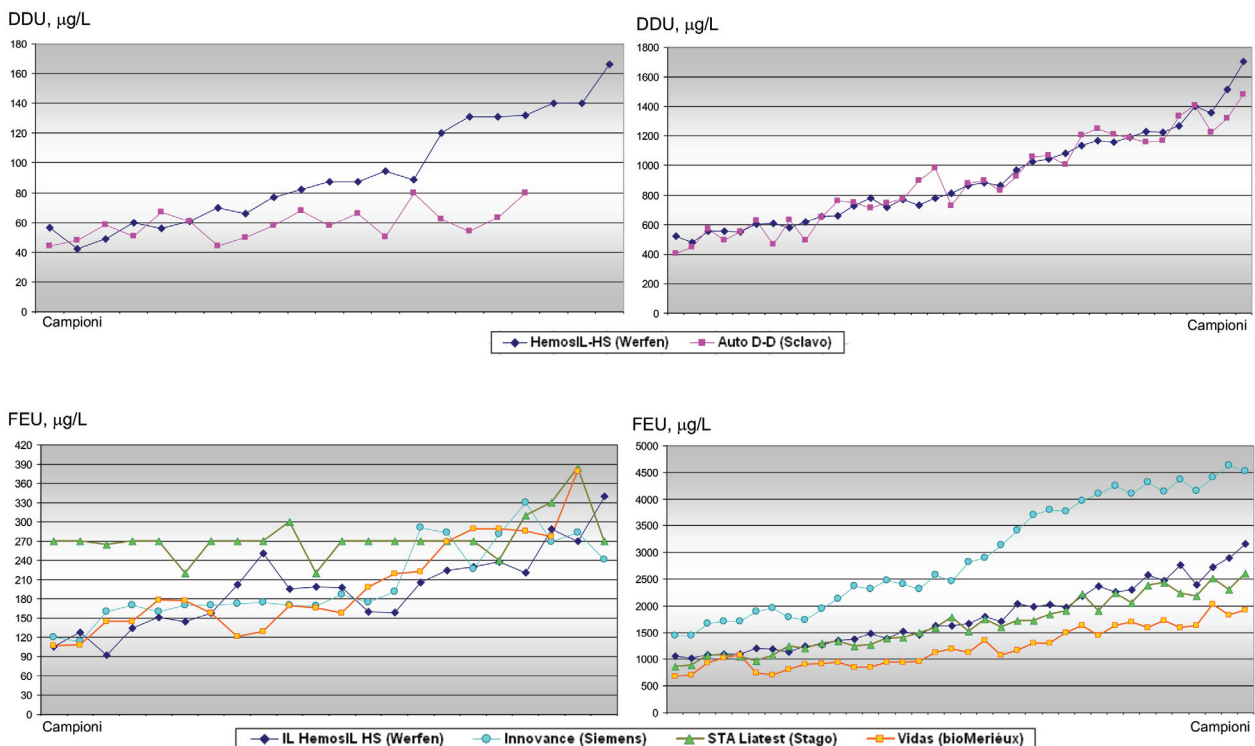
In Figura 1 sono riportate le unità di misura utilizzate dai partecipanti alla VEQ.

Attualmente circa il 55% dei partecipanti esprime i risultati in FEU, questa leggera prevalenza del FEU rispetto al DDU risulta pressoché costante negli ultimi 7 anni di VEQ con un valore medio di 55,6%.

Tra i partecipanti che esprimono il D-dimero in FEU, il 57,9% utilizza come unità di misura ng/mL, il 21,0% µg/mL, il 15,8% µg/L e il 5,3% mg/L. Tra i partecipanti che esprimono il D-dimero in DDU, il 67,8% utilizza ng/mL, il 29,0% µg/L, e il 3,2% mg/L.

### Variabilità analitica

In Figura 2 è riportato il valore medio del D-dimero,



**Figura 2**

Valori mediani del D-dimero ( $\mu\text{g/L}$ ) dei diversi sistemi analitici utilizzati dai partecipanti alla VEQ del CRB, relativi a 72 campioni di controllo, rappresentati in funzione della concentrazione crescente.

I due pannelli di sinistra sono relativi a campioni di controllo con concentrazioni nell'ambito della normalità mentre i due pannelli di destra si riferiscono a campioni con concentrazioni patologiche. DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

ottenuto con i diversi sistemi diagnostici, sui 72 campioni di controllo, ordinati a concentrazioni crescenti.

Relativamente ai campioni con concentrazioni inferiori al livello decisionale, si osserva un'ampia variabilità di risultati. Da notare che per i campioni di controllo a concentrazione bassa non tutti i laboratori forniscono il valore numerico, mentre altri riportano il risultato anche se inferiore al valore minimo dell'intervallo analitico indicato dal produttore. Per campioni patologici, le concentrazioni risultano sovrapponibili per i due sistemi diagnostici che sono calibrati con il D-dimero purificato e che quindi esprimono i risultati in DDU (HemosIL-HS e Auto D-D). Per i sistemi diagnostici calibrati con fibrina stabilizzata digerita con plasmina, e che quindi esprimono i risultati in FEU, le concentrazioni risultano pressoché sovrapponibili per HemosIL-HS e STALiatest, mentre Innovance fornisce valori notevolmente più elevati e VIDAS valori inferiori, lungo tutto l'intervallo di concentrazione.

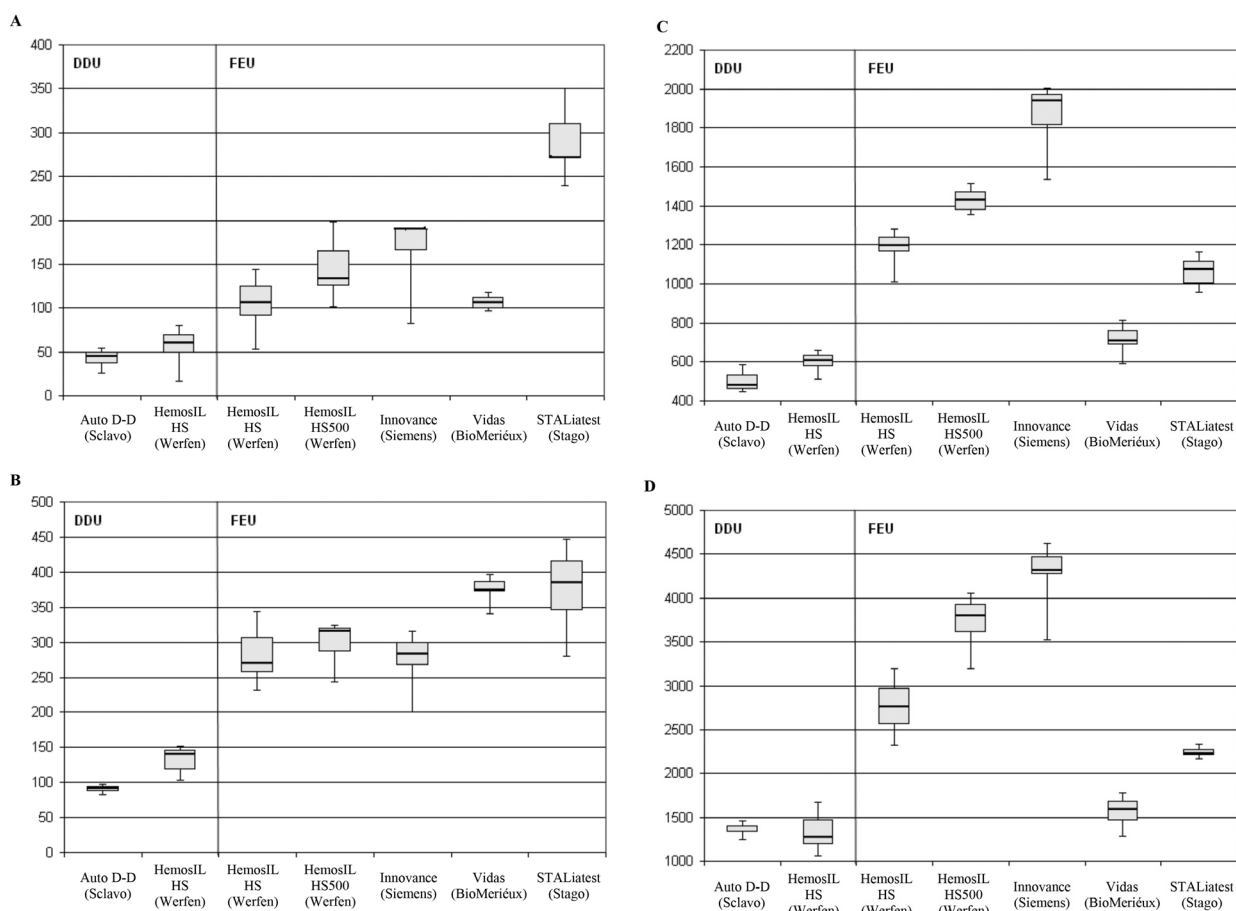
In Figura 3 il grafico a box-plot (diagramma a scatola

e baffi) riporta i risultati ottenuti su 4 campioni di controllo a diversa concentrazione (A, B, C, D) suddivisi per sistema analitico.

Sono compresi tutti i valori numerici forniti dai partecipanti anche se alcuni sono inferiori rispetto al limite di rilevabilità indicato dal produttore.

Per i due campioni con concentrazioni superiori al livello decisionale (C e D) le differenze tra i sistemi sono risultate pressoché costanti, mentre per i due campioni con concentrazioni inferiori al livello decisionale (A e B) si nota un diverso comportamento dei sistemi analitici studiati.

In Tabella 2 sono riportati i CV% medi riscontrati nei campioni di controllo suddivisi in 4 intervalli di concentrazione. Per valori di D-dimero inferiori al livello decisionale (livello 1 e 2) il CV% supera quello raccomandato del 10%, per tutti i sistemi analitici ad eccezione di VIDAS e STALiatest mentre per valori patologici (livello 3 e 4) è risultato <10% per tutti i sistemi analitici ed è compreso tra 4,5% e 7,2%.



**Figura 3**

Risultati del D-dimero ( $\mu\text{L}$ ), ottenuti con i sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ del CRB, relativi a 4 campioni di controllo con valori nell'intervallo di normalità (A e B) e con valori patologici (C e D).

DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

**Tabella 2**

Variabilità inter-laboratori dei principali sistemi utilizzati dai partecipanti alla VEQ.

Sistema analitico	Unità di misura	Numerosità	Livello	Intervallo analitico $\mu\text{g/L}$	N. campioni	CV% media $\pm$ DS
<b>Auto D-D</b> (Sclavo)	DDU	12 $\pm$ 5	1	50 - 115	14	22,1 $\pm$ 11,2
			2	63 - 170	5	12,6 $\pm$ 6,1
			3	402 - 896	16	5,0 $\pm$ 3,1
			4	728 - 1482	20	5,6 $\pm$ 2,5
<b>HemosIL-HS</b> (Werfen)	DDU	23 $\pm$ 4	1	70 - 131	17	16,8 $\pm$ 5,1
			2	108 - 166	8	12,4 $\pm$ 5,1
			3	480 - 780	16	5,9 $\pm$ 2,1
			4	781 - 1705	20	7,2 $\pm$ 3,7
<b>HemosIL-HS</b> (Werfen)	FEU	13 $\pm$ 4	1	82 - 251	26	14,8 $\pm$ 5,6
			2	206 - 340	8	13,5 $\pm$ 1,7
			3	1016 - 1517	16	4,5 $\pm$ 1,9
			4	1622 - 3158	20	6,2 $\pm$ 2,6
<b>HemosIL-HS500</b> (Werfen)	FEU	8 $\pm$ 1	1	151 - 227	11	16,3 $\pm$ 8,0
			2	316	1	8,2
			3	1430 - 2033	5	5,7 $\pm$ 3,2
			4	1858 - 3856	8	5,0 $\pm$ 1,9
<b>Innovance</b> (Siemens)	FEU	14 $\pm$ 4	1	160 - 191	12	11,5 $\pm$ 6,4
			2	227 - 331	8	12,4 $\pm$ 4,9
			3	1439 - 2468	16	6,4 $\pm$ 2,6
			4	2463 - 4629	20	6,1 $\pm$ 2,0
<b>Vidas</b> (BioMérieux)	FEU	10 $\pm$ 3	1	84 - 219	28	7,6 $\pm$ 3,0
			2	138 - 379	8	6,8 $\pm$ 4,6
			3	673 - 1071	16	5,6 $\pm$ 2,2
			4	1072 - 2019	20	5,3 $\pm$ 2,7
<b>STALiatest</b> (Stago)	FEU	9 $\pm$ 3	1	220 - 300	28	6,2 $\pm$ 5,6
			2	240 - 385	8	10,1 $\pm$ 8,7
			3	860 - 1490	16	5,7 $\pm$ 2,4
			4	1520 - 2600	20	4,6 $\pm$ 1,5

DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

#### Livelli decisionali

In Figura 4 sono riassunti i livelli decisionali adottati dai partecipanti alla VEQ, relativi ad un maschio di 50 anni di età. Per quanto riguarda il D-dimero refertato come DDU, il livello decisionale maggiormente utilizzato è 250  $\mu\text{g/L}$ , come suggerito dai produttori, ma, anche nell'ambito dello stesso sistema analitico, alcuni laboratori fissano il livello decisionale a 200  $\mu\text{g/L}$  e uno a

300  $\mu\text{g/L}$ . Relativamente al D-dimero refertato in FEU, il livello decisionale maggiormente utilizzato è 500  $\mu\text{g/L}$ , un laboratorio lo fissa a 550  $\mu\text{g/L}$  e un altro a 400  $\mu\text{g/L}$ , pur nell'ambito dello stesso sistema analitico. Un errore da imputare alla fase post-analitica che riguarda vari costituenti è quello di esprimere i risultati con una unità di misura e il livello decisionale con una diversa unità come nel caso riportato in Figura 4.



8 modalità di refertazione diverse. Ed è particolarmente allarmante il possibile utilizzo di DDU o FEU (come riportato sopra FEU = 2 DDU), in due laboratori appartenenti allo stesso comprensorio ma a due diverse organizzazioni (esempio ULSS e Azienda Ospedaliera). Quando un paziente viene trasferito da una struttura che referta il D-dimero in DDU ad un'altra che utilizza il FEU, anche se con la stessa unità di misura, il risultato numerico del secondo laboratorio sarà il doppio del primo (300 µg/L DDU = 600 µg/L FEU) e questo può essere fuorviante per i clinici. Lo scambio di un risultato in DDU con quello in FEU e viceversa può infatti generare misure terapeutiche scorrette e la modalità di refertazione una concreta possibilità di rischio clinico.

### Variabilità analitica

La mancanza di un materiale di riferimento per il D-dimero rende impossibile il confronto diretto tra i risultati dei diversi sistemi. Anche i dati riportati in Figura 2 e 3 confermano che i risultati del D-Dimero sono sistema analitico-dipendenti. Tutti i metodi immunoturbidimetrici forniscono risultati (espressi in FEU) più elevati rispetto al metodo ELFA utilizzato da VIDAS (quello con le concentrazioni più elevate è Innovance). Se tra i sistemi immunoturbidimetrici e il metodo ELFA le differenze potrebbero essere dovute in parte alle diverse modalità di rilevazione, i bias sistematici tra i metodi immunoturbidimetrici indicano che alcune variabili (calibrazione, specificità anticorpale, applicazione del metodo, sostanze interferenti) sono scarsamente controllate.

Sono disponibili poche informazioni relative alle prestazioni dei sistemi analitici per la determinazione del D-dimero ottenute mediante Programmi di VEQ; tuttavia quelle disponibili hanno sempre evidenziato una grande variabilità di risultati tra i diversi sistemi analitici, alcuni dei quali possono fornire concentrazioni fino a 20 volte superiori a quelle di altri (36). Consistenti variazioni nella concentrazione del D-dimero, anche tenendo conto di possibili problemi di non-commutabilità dei materiali di controllo, erano già state osservate in passato sia nel nostro programma di VEQ (37), sia in un altro programma di VEQ italiano (38). Anche i risultati del programma di VEQ australiano, ottenuti su 3 campioni di controllo a diversa concentrazione, hanno evidenziato differenze tra i sistemi STALiatest e VIDAS analoghe a quelle riscontrate nel nostro studio (19). La scarsa armonizzazione nei risultati del D-dimero è sicuramente un problema internazionale: anche nello studio del College of American Pathologists (CAP) condotto dal 2004 al 2011 si è osservata un'ampia variabilità intermetodo, con CV fino al 42%, e per alcuni sistemi una scarsa riproducibilità (39).

Il programma di VEQ del CRB elabora i risultati solo per metodo omogeneo (stesso sistema analitico): per valori molto inferiori al livello decisionale, si è osservata un'ampia variabilità analitica (con CV% medi anche del 20%) e <10% solo per i sistemi analitici VIDAS e STALiatest, mentre per concentrazioni patologiche la

variabilità analitica è risultata contenuta per tutti i sistemi diagnostici.

La partecipazione a Programmi di VEQ, oltre ad essere un requisito fondamentale per l'accreditamento dei laboratori clinici (40), può aiutare i partecipanti nella scelta dei sistemi analitici che presentano una minore variabilità intra-metodo.

### Livelli decisionali

È noto che l'utilizzo di livelli decisionali incrementali in funzione dell'età rappresenta un elemento fondamentale per aumentare la specificità diagnostica di questo biomarcatore per la diagnosi e la valutazione prognostica dei pazienti con tromboembolismo venoso (41-43).

Dai dati raccolti mediante il programma di VEQ del CRB, non è possibile evincere quanti laboratori utilizzino per il D-dimero livelli decisionali diversi in funzione dell'età; è possibile solo riportare i livelli decisionali adottati dai partecipanti per un soggetto maschio di 50 anni.

La maggior parte dei partecipanti utilizza lo stesso livello decisionale, e precisamente quello riportato nei foglietti illustrativi dei vari produttori: 250 µg/L DDU e 500 µg/L FEU.

### Limiti dello studio

I campioni di controllo distribuiti nel corso dei vari cicli di VEQ, per la difficoltà nel reperire campioni di controllo a ben definite concentrazioni, rientrano nei valori o normali o patologici e pertanto non è stato possibile trarre conclusioni per valori di D-dimero vicini al livello decisionale.

Nei programmi di VEQ del CRB le informazioni relative agli IR e ai livelli decisionali, sono raccolte su base volontaria e si chiede ai partecipanti di riferirli ad un soggetto adulto maschio (50 anni). Non è stato possibile pertanto valutare se i partecipanti impiegano livelli decisionali fissi o aggiustati per età e la relativa concordanza.

### CONCLUSIONI

Il nostro studio evidenzia ancora una volta la necessità di armonizzare le modalità di refertazione del D-dimero nei laboratori italiani (44,45).

Questa necessità emerge ancor più quando si riportano i dati degli studi relativi al COVID-19, data l'importanza che può avere questo parametro nell'influenzare il processo decisionale clinico (19,46).

Nella Comunicazione dell'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) viene raccomandato di indicare sempre: il tipo di sistema analitico utilizzato e le sue caratteristiche (come ad esempio sensibilità, specificità); di refertare i risultati in FEU, µg/L; di indicare sempre il livello decisionale (47). I Programmi di VEQ possono essere un valido supporto alla diffusione di queste raccomandazioni e avere un

importante ruolo nel promuovere l'armonizzazione nella refertazione di questo utile biomarcatore (48,49).

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice. *Clin Chem* 2011;57:1256-62. *Biochim Clin* 2012;36:196-203.
2. Morelli B, Montaruli B, Bazzan M, et al. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020;44:15-6.
3. Lippi G, Favaloro EJ. D-dimer is associated with the severity of Coronavirus disease 2019: a pooled analysis. *Thromb Haemost* 2020;120:876-7.
4. Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 2020;18:1094-9.
5. Yao Y, Cao J, Wang Q, et al. D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: a case control study. *JINC* 2020;8:49. Doi:10.1186/s40560-020-00466-z
6. Yu H-H, Qin C, Chen M, et al. D-dimer is associated with the severity of COVID-19. *Thromb Res* 2020;195:219-25.
7. Li Y, Zhao K, Wei H, et al. Dynamic relationship between D-dimer and COVID-19. *Br J Haematol* 2020;190, e1-e38.
8. Thachil J, Lippi G, Favaloro EJ. D-dimer testing: laboratory aspects and current issues. *Methods Mol Biol* 2017; 1646:91-104.
9. Favresse J, Lippi G, Roy PM, et al. D-dimer: preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin* 2018;55:548-77.
10. Gaffney PJ, Edgell T, Creighton-Kempford LJ, et al. Fibrin degradation product (FnDP) assays: analysis of standardization issues and target antigens in plasma. *Br J Haematol* 1995;90:187-94.
11. Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997;7:1031-3.
12. Dempfle CE, Zips S, Ergul H, et al. The fibrin assay comparison trial (FACT): correlation of soluble fibrin assays with D-dimer. *Thromb Haemost* 2001;86:1204-9.
13. Meijer P, Klufft C. The harmonization of quantitative test results of different D-dimer methods. *Semin Vasc Med* 2005;5:321-7.
14. Meijer P, Haverkate F, Klufft C, et al. A model for the harmonisation of test results of quantitative D-dimer methods. *Thromb Haemost* 2006;95:567-72.
15. Jennings I, Woods TA, Kitchen DP, et al. Laboratory D-dimer measurement improved agreement between methods through calibration. *Thromb Haemost* 2007;98:1127-35.
16. Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, et al. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb Haemost* 2013;132:457-64.
17. Riley RS, Gilbert AR, Dalton JB, et al. Widely used types and clinical applications of D-Dimer assay. *Lab Medicine* 2016;47:90-102.
18. Johnson ED, Schell JC, Rodgers GM. The D-dimer assay. *Am J Hematol* 2019;94:833-9.
19. Favaloro EJ, Thachil J. Reporting of D-dimer data in COVID-19: some confusion and potential for misidentification. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1191-9.
20. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, JAMA 2020;323:1061-9.
21. Gao Y, Li T, Han M, et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol* 2020;92:791-6.
22. Guo W, Li M, Dong Y, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev* 2020 Mar 31;e3319. doi: 10.1002/dmrr.3319.
23. Pittet JL, De Moerloose P, Reber G, et al. VIDAS® D-dimer: fast quantitative ELISA for measuring D-dimer in plasma. *Clin Chem* 1996;42:410-5.
24. Mountain D, Jacobs I, Haig A. The VIDAS D-dimer test for venous thromboembolism: a prospective surveillance study shows maintenance of sensitivity and specificity when used in normal clinical practice. *Am J Emerg Med* 2007;25:464-71.
25. Herak DC, Milos M, Zadro R. Evaluation of the Innovance D-Dimer analytical performance. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:945-51.
26. De Moerloose P, Vanrusselt M, Reber G, et al. Performances of the Hemosil D-dimer HS assay for the exclusion of venous, thromboembolism *J Thromb Haemost* 2005;3:2361-3.
27. Legnani C, Cini M, Scarvelis D, et al. Multicenter evaluation of a new quantitative highly sensitive D-dimer assay, the Hemosil D-dimer HS 500, in patients with clinically suspected venous thromboembolism. *Thromb Res* 2010;125:398-401.
28. Aguilar C, Sartori M, D'Angelo A, et al. on behalf of the DiET Study Group. Validation of the STA-Liatest DDi assay for exclusion of proximal deep vein thrombosis according to the latest Clinical and Laboratory Standard Institute/Food and Drug Administration guideline: results of a multicenter management study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2018;29:562-6.
29. Legnani C, Cini M, Frascaro M, et al. Diagnostic accuracy of a new D-Dimer assay (Sclavo Auto D-Dimer) for exclusion of deep vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Clin Appl Thromb* 2017;23:221-8.
30. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: requests, samples, measurements and reports. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;15:1-13.
31. Secchiero S, Sciacovelli L, Faggian A, et al. Gli strumenti di assicurazione della Qualità in Medicina di Laboratorio: i Programmi di VEQ e gli Indicatori di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica. *Ligand Assay* 2013;18:41-53.
32. Lippi G, Tripodi A, Simudic AM, et al. International survey on D-dimer test reporting: a call for standardization. *Semin Thromb Hemost* 2015;41:287-93.
33. Lippi G, Morelli B, Tripodi A. Indagine sulla modalità di refertazione dell'esame D-dimero nei laboratori nazionali e indicazioni per una sua armonizzazione. *Biochim Clin* 2015;39:591-4.
34. Lippi G, Cervellin G, Casagrande I, et al. D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. Consensus document of AcEMC, CISMEL, SIBioC, and SIMEI. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:621-8.
35. Lippi G, Cervellin G, Casagrande I, et al. Documento di consenso di "Academy of Emergency Medicine and Care", Comitato Italiano per la standardizzazione dei metodi ematologici e di laboratorio, SIBioC – Medicina di Laboratorio e Società Italiana di Medicina di laboratorio sull'utilizzo del dosaggio del D-dimero per il sospetto di tromboembolismo venoso in condizioni di urgenza. *Biochim Clin* 2014;38:136-8.

36. Spannagl M, Haverkate F, Hans R, et al. The performance of quantitative D-dimer assays in laboratory routine. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:439-43.
37. Plebani M, Sanzari MC, Zardo L. Quality control in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:642-6.
38. Tripodi A, Chantarangkul V. Performance of quantitative D-dimer methods: results of the Italian external quality assessment scheme. *J Thromb Haemost* 2007;5:184-5.
39. Olson JD, Cunningham MT, Higgins RA, et al. D-dimer – Simple test, tough problems. *Arch Pathol Lab Med* 1913; 137:1030-8.
40. ISO 15189:2012. Medical laboratories. Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, Geneva 2012.
41. Legnani C, Palareti G, Cosmi B, et al. for the PROLONG Investigators on behalf of FCSA, Italian Federation of Thrombosis Centers). Different cut-off values of quantitative D-dimer methods to predict the risk of venous thromboembolism recurrence: a post-hoc analysis of the PROLONG study. *Haematol* 2008;93:900-7.
42. Lippi G, Favaloro EJ, Cervellin G. A review of D-dimer testing for prediction of recurrent venous thromboembolism with increasing age. *Semin Thromb Hemost* 2014;40:634-9.
43. Palareti G, Legnani C, Antonucci E, et al. for the DULCIS (D-dimer and ULtrasonography in Combination Italian Study) Investigators. D-dimer testing, with gender-specific cutoff levels, is of value to assess the individual risk of venous thromboembolic recurrence in non-elderly patients of both genders: a post hoc analysis of the DULCIS study. *Intern Emerg Med* 2020;15:453-62.
44. Longstaff C, Adcock D, Olson JD, et al. Harmonisation of D-dimer – A call for action. *Thromb Res* 2016;137:219-20.
45. Favaloro EJ, Lippi G. On the complexity of hemostasis and the need for harmonization of test practice. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1568-74.
46. Aloisio E, Serafini L, Chibireva M, et al. Hypoalbuminemia and elevated D-dimer in COVID-19 patients: a call for result harmonization. *Chin Chem Lab Med* 2020;58:e255-6.
47. Tachil J, Longstaff C, Favaloro E, et al. The need for accurate D-dimer reporting in COVID-19: Communication from the ISTH SCC on fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2020;18:2408-11.
48. Preston FE, Lippi G, Favaloro EJ. Quality issues in laboratory haemostasis. *Haemophilia* 2010;16, Suppl 5:93-9.
49. Favaloro EJ, Jennings I, Olson J, et al. Towards harmonization of external quality assessment/proficiency testing in hemostasis. *Chin Chem Lab Med* 2019;57:115-26.

## La Fibrosi Cistica: comorbidità, geni modificatori e medicina di precisione

**Marcella Nunziato**

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche - Università degli Studi di Napoli Federico II  
CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, sotto forma di Poster, ricevendo il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati*

### ABSTRACT

#### **Cystic Fibrosis: comorbidities, modifier genes and precision medicine.**

Cystic Fibrosis (CF) is a serious genetic disease, autosomal recessive, monogenic, which equally involves males and females mainly of Caucasian populations (1 affected for every 2 500 - 3 000 newborns). The first symptoms are evident from birth or within 2 years of age with respiratory infections and growth difficulties which are, at first, the most evident signs. The genetic basis of CF has been definitively clarified with the identification of the disease-gene in 1989, and more than 2 000 different mutations are known, today, throughout the gene. The clinical characteristics of the disease are very heterogeneous, its phenotyping turns out to be, in fact, multi-organs. Given the great complexity of the phenotypes associated with CF and the presence of many comorbidities, the question whether genetics, and therefore the presence of modifying/modulating genes of the phenotype, could play a role in the manifestation and in the severity of symptoms is of fundamental importance. Several linkage and Genome Wide Association (GWAS) studies have been useful in this context and to date there are a number of evidences of the presence of CF modifier genes. Personalized medicine, a continuously developing field, has allowed the development of numerous therapeutic strategies, also directed towards specific genomic mutations.

### INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è una grave malattia genetica, autosomica recessiva, monogenica, che coinvolge egualmente sia maschi che femmine, molto comune nelle popolazioni caucasiche (1).

In Italia e nel mondo occidentale, si stima che ci sia 1 affetto ogni 2 500 - 3 000 nuovi nati (in Italia si contano 200 nuovi casi all'anno): sono quasi 6 000 gli affetti da FC (bambini, adolescenti e adulti) che vengono curati nei centri specializzati presenti su tutto il territorio italiano. La frequenza dei portatori sani di mutazioni del gene *CFTR* è approssimativamente 1 ogni 25/26 persone: due portatori sani hanno 1 probabilità su 4 di generare un figlio affetto da FC ([www.fibrosicisticaricerca.it](http://www.fibrosicisticaricerca.it)).

In Sud America, Africa, Turchia, Medio Oriente e Asia, le numerose recenti pubblicazioni scientifiche dimostrano che la FC, non è così rara come si riteneva;

piuttosto, l'alta incidenza di tubercolosi, la malnutrizione, l'importante diffusione dell'infezione da HIV e l'elevata mortalità infantile, mascherano la presenza della FC e spesso i bambini muoiono senza avere una corretta valutazione diagnostica (2).

Molti dei pazienti mostrano i primi sintomi sin dalla nascita o subito dopo (il 75% dei casi presentano i segni prima dei 2 anni d'età), le infezioni respiratorie e difficoltà nella crescita sono i sintomi più ricorrenti (3,4).

L'individuazione del gene-malattia nel 1989 ha definito le basi genetiche della FC (5); si tratta, pertanto, di una malattia monogenica, con caratteristiche cliniche molto eterogenee, causata da mutazioni nel gene *CFTR*. Il gene codifica per una proteina di membrana che svolge la funzione di canale ionico per lo ione cloruro (Cl<sup>-</sup>), mentre lo ione Na<sup>+</sup>, in controtendenza, richiama anche acqua rendendo il muco molto denso. La proteina è un tipico trasportatore ABC (ATP-Binding Cassette), ma in più presenta un dominio regolatore e, come detto,

Corrispondenza a: Marcella Nunziato, Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche - Università degli Studi di Napoli Federico II, E-mail [nunziato@ceinge.unina.it](mailto:nunziato@ceinge.unina.it)

Ricevuto: 18.02.2021

Revisionato: 21.03.2021

Accettato: 25.03.2021

Pubblicato on-line: 27.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.023

agisce da canale per gli ioni del cloro (6). Mutazioni nel gene comportano una disfunzione nella fluidificazione delle secrezioni, con accumulo di muco nel polmone, nel pancreas e in altri organi (si tratta, infatti, di una patologia multi-organo), principalmente causando ostruzioni nel tratto gastrointestinale e respiratorio con conseguenti frequenti infezioni batteriche soprattutto delle vie aeree (1). Nei pazienti affetti da FC, il sottile strato di muco che normalmente ricopre la superficie interna dei polmoni è rigido, e molto spesso; costituisce un ostacolo per il flusso d'aria, ed è anche un ottimo terreno per la proliferazione di batteri patogeni (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i più frequenti). Inoltre, il 32% degli adulti affetti, con età compresa tra 20 e 64 anni presenta 5 o più comorbidità e il loro numero tende ad aumentare con l'avanzare dell'età (7,8).

Ad oggi sono note più di 2 000 diverse mutazioni lungo tutto il gene, di cui 400 con effetto noto; la delezione p.Phe508del è quella più comune (9), in particolare, in Europa più dell'80% dei pazienti è portatore di questa delezione che, tuttavia, presenta una frequenza maggiore nelle popolazioni Nord Europee rispetto a quelle Sud Europee (83% in Danimarca contro il 40-60% in Spagna, Italia e Grecia) (10). Le mutazioni del gene *CFTR* sono state classificate in base alle conseguenze funzionali, cioè sulla loro capacità di interferire sul trasporto ionico della proteina. In particolare, si tratta di difetti di sintesi/blocco della maturazione della proteina o ridotta funzione a livello della membrana cellulare (Figura 1). Si distinguono sette diverse categorie:

- la classe I, comprende mutazioni che comportano un difetto di sintesi (mutazioni nonsense, mutazioni che comportano un cambio della cornice di lettura (frameshift) e mutazioni nei siti di splicing);

- la classe II, in cui si riscontra un difetto di "processamento", termine usato per indicare le modificazioni post-trascrizionali dell'RNA e/o post-traduzionali delle proteine (che pertanto alterano le funzioni delle proteine stesse, mutazioni missenso e delezioni di un amminoacido; la mutazione più comune, la p.Phe508del, fa parte di questa classe);
- la classe III, un difetto di gating (regolazione difettosa del canale, mutazioni missenso e cambio di un amminoacido);
- la classe IV, con difetti della conduttanza del canale (mutazioni missenso e cambio di un amminoacido);
- la classe V, difetti di splicing del messaggero (mutazioni missenso e di splicing);
- la classe VI in cui si riscontrano difetti di stabilità della proteina (mutazioni missenso e cambio di un amminoacido);
- la classe VII, descritta in tempi recentissimi, in cui si ritrovano tutte le mutazioni che comportano un blocco dell'RNA messaggero e, quindi, vi è totale assenza della proteina CFTR analogamente a quanto succede per le mutazioni di classe I (11-13).

In Italia, nel 2019 è stato approvato il "Consensus 2019 per l'analisi genetica della FC" che va a sostituire le indicazioni contenute nel testo del 2005. Il documento vuole essere una guida per tutti gli operatori del settore: la prima parte descrive la malattia, l'importanza della consulenza genetica e le strategie generali per la ricerca delle mutazioni causative già note e la caratterizzazione delle nuove varianti. La seconda parte descrive tutte le strategie disponibili per l'analisi della FC nei neonati e nei genitori (14).

Risulta utile ricordare il flusso di lavoro ad oggi suggerito per giungere ad una analisi definitiva durante lo screening neonatale: una diagnosi precoce e accurata è fondamentale per iniziare quanto più

<b>Classificazione Tradizionale</b>	Classe I		Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Classe VI
<b>Classificazione di De Boeck e Amaral</b>	Classe VII	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Classe VI
<b>Difetto di CFTR</b>	No mRNA	No proteina	No Traffico	Gating alterato	Conduttanza ridotta	Meno proteina	Meno stabilità
<b>Esempi di mutazioni</b>	Del2,3 (21 kb) c.1717-TG>A	p.Gly542X, p.Trp1282X	p.Phe508del, p.Asn1303Lys, p.Ala561Glu	p.Gly551Asp, p.Ser549Arg, p.Gly1349Asp	p.Arg117His, p.Arg334Trp, p.Ala455Glu	c.3272-26A>G, c.3849+10C>T	c.120del123, p.Phe580del
<b>Caratteristiche cliniche (globalmente)</b>	Patologia più severa				Patologia meno severa		

**Figura 1**  
Stato mutazionale del gene *CFTR* e, quindi, della proteina da esso codificata. In dettaglio è mostrata la classificazione tradizionale e quella di De Boeck e Amaral (rif 13); i relativi difetti nella sintesi di CFTR e alcuni esempi di mutazioni sempre divisi per classe corrispondente. Fenotipicamente (in base alle mutazioni riscontrate) è possibile distinguere una patologia più severa da una più lieve. Modificata da Marson FLA (rif 12)

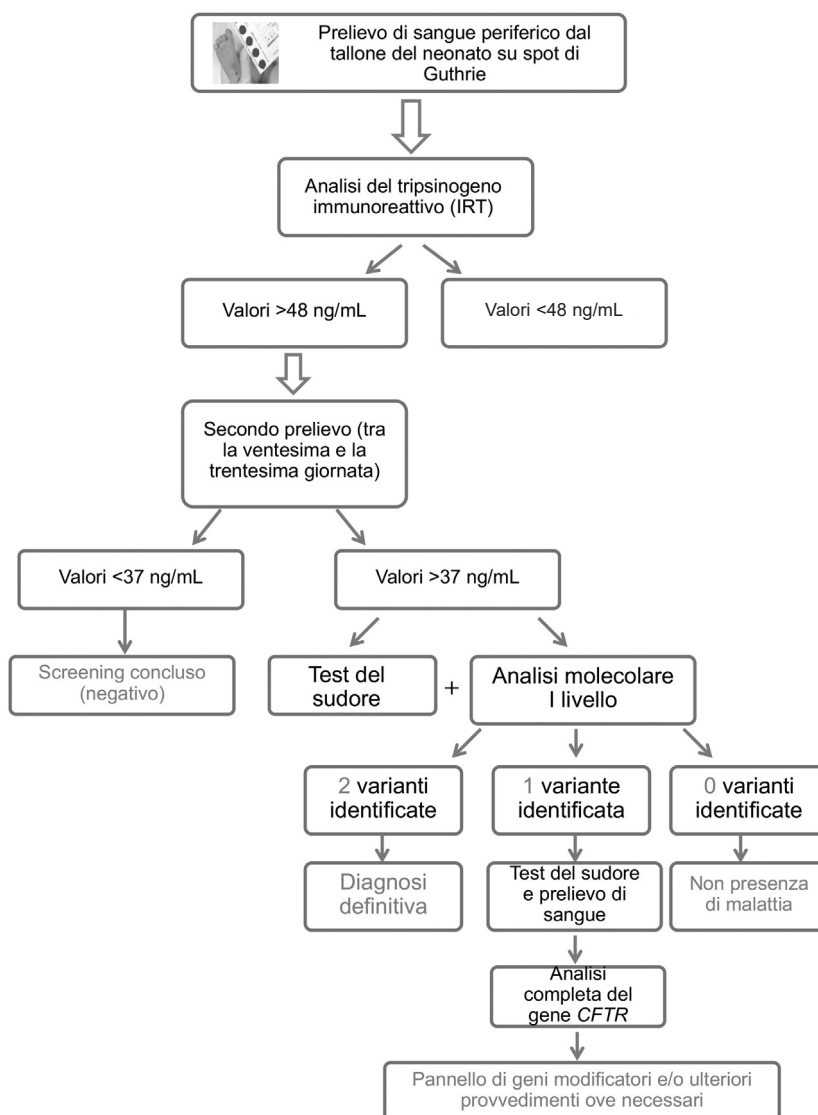
velocemente possibile la terapia più adatta (Figura 2). Non sorprende che la presentazione dei fenotipi FC tessuto-specifici sia altamente dipendente dal tipo di mutazione, dall'ambiente e dalla presenza dei cosiddetti "geni modulatori della FC" (vedi paragrafo dedicato).

La medicina di precisione, negli ultimi anni, ha consentito, attraverso una terapia con farmaci mirati verso i vari tipi di mutazioni di migliorare notevolmente l'aspettativa di vita (che oggi supera anche i 50-60 anni di età) ma anche di migliorarla qualitativamente attraverso la cura e il monitoraggio delle varie comorbidità che si sviluppano con la malattia stessa (15).

### COMORBIDITÀ ASSOCIATE ALLA FIBROSI CISTICA

La FC è una patologia dalle caratteristiche cliniche molto eterogenee, le sue fenotipizzazioni sono multi-organo. Quelle più comuni si riscontrano oltre che a livello polmonare, anche frequentemente a livello pancreatico, epato-biliare, gastrointestinale, renale, dell'apparato uro-genitale, osseo, e cutaneo (16).

A livello polmonare le bronchiectasie e le infezioni polmonari sono un segno distintivo della FC ma ci sono anche ulteriori morbidità sempre a carico dello stesso organo (17). Lo pneumotorace ha un'incidenza annuale dello 0,64% negli affetti da FC; più del 3% dei pazienti



**Figura 2** Strategia ad oggi utilizzata per la diagnosi della fibrosi cistica nei neonati. Si parte dal prelievo di sangue effettuato al momento della nascita su spot di Guthrie e si procede con la determinazione del tripsinogeno immunoreattivo, seguito eventualmente da analisi molecolare e test del sudore.

manifesta almeno uno pneumotorace durante il corso della vita, con un rischio di recidiva compreso tra il 50 e il 90%. L'emottisi può essere riscontrata in circa il 9% dei pazienti con FC. Di solito, si tratta dell'emissione di un piccolo volume di sangue, situazioni più gravi e massive si verificano negli anziani affetti. I fattori di rischio includono la positività dell'espettorato dopo la coltura per lo *Staphylococcus aureus* e la presenza di diabete (18). La rino-sinusite è stimata tra il 32-65% e la prevalenza dei polipi nasali è intorno al 25%. Il muco denso prodotto provoca infezioni ricorrenti che tendono a cronicizzare portando poi ad uno stato infiammatorio cronico (19). È stato dimostrato, inoltre, che l'ipertensione polmonare nei pazienti con FC è correlata all'ipossiemia e alla disfunzione polmonare (20).

L'insufficienza pancreatica si attesta intorno all'85-90% nei pazienti affetti da FC e tende ad aumentare con l'età (21). Il ridotto trasporto di secrezioni contenenti enzimi pancreatici provoca un processo di autodigestione pancreatica con il conseguente sviluppo di insufficienza d'organo. Si riscontra anche scarso aumento di peso (soprattutto nei neonati), malassorbimento dei grassi e delle vitamine liposolubili (vitamine A, D, E, K), gonfiore addominale e/o flatulenza (22). Nel corso della malattia, è possibile che pazienti senza l'insufficienza pancreatica incorrano in un aumento dei sintomi gastrointestinali, perdita di peso e intolleranza ai cibi grassi. Non è raro, in questi pazienti, lo sviluppo di pancreatiti con episodi intermittenti di ostruzione duttale dovuti a secrezione pancreatica semi-viscosa; attacchi ricorrenti possono portare anche alla distruzione della funzione pancreatica residua (23). Il diabete associato a FC è una comorbidità molto comune nelle persone affette con una prevalenza stimata del 25% negli adolescenti e fino al 80% negli adulti. I pazienti con diabete associato alla FC hanno un contenuto ridotto di cellule beta nel pancreas e una conseguente riduzione della produzione di insulina; tuttavia, non presentano chetoacidosi diabetica finché non avviene una completa distruzione delle cellule beta pancreatiche (24).

Nel 3-5% dei pazienti con FC, si possono verificare anche patologie a carico del fegato. La cirrosi epatica è la causa di morte non respiratoria più comune negli affetti, rappresentando circa il 2,5% della mortalità associata alla FC. L'incidenza di complicanze epatiche è riportata essere più alta nella prima decade di vita, con un forte calo nella seconda. La secrezione biliare viscosa causa ristagno con conseguente ostruzione duttale fino ad arrivare alla cirrosi epatica (25).

Tra le patologie del tratto gastrointestinale ci sono l'ileo da meconio (MI) e la sindrome da ostruzione intestinale distale (DIOS). Il 10-15% dei pazienti presenta ileo da meconio già alla nascita; consiste in un'ostruzione intestinale dovuta all'accumulo di muco inspirato, materiale fecale e motilità gastrointestinale anomala. Il 10-47% dei pazienti anziani affetti da FC possono invece sviluppare episodi intermittenti di ostruzione intestinale completa o parziale a causa

dell'accumulo di feci, specialmente a livello della giunzione ileo-cecale. Nel 40% dei casi, gli affetti si lamentano di costipazione, mentre l'80% soffre di reflusso gastro-esofageo (26).

Le complicanze renali aumentano con l'aumentare dell'età. L'incidenza di danno renale acuto (AKI) nei pazienti in età pediatrica con FC varia da 4,6 a 10,1 casi per 10 000 all'anno; i pazienti con FC sono a maggior rischio di perdita di sali e conseguente disidratazione che può predisporre all'AKI. La calcolosi renale è comune nelle persone con FC così come anche la nefropatia con livelli elevati di IgA. I livelli aumentati di IgA sono dovuti a infezioni ricorrenti e infiammazioni croniche che possono dare origine a glomerulonefrite. I pazienti con FC possono, inoltre, sviluppare amiloidosi secondaria che può portare alla sindrome nefrosica. Entrambe sono associate a una prognosi sfavorevole in questi pazienti (27).

Sebbene la spermatogenesi sia normale, negli uomini con FC può verificarsi un'assenza congenita bilaterale del dotto deferente (Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens, CBAVD) e la conseguente infertilità che si verifica nel 95-98% degli affetti. Sebbene l'eziologia della CBAVD correlata alla FC rimanga per molti aspetti ancora non pienamente chiarita, la principale differenza tra la forma classica di FC e la CBAVD-FC è da ricercarsi, ma solo parzialmente, nell'identificazione di mutazioni o varianti nel gene *CFTR* come ad esempio la presenza dei polimorfismi nell'introne 8 del gene (tratti Poly-T e Poly-TG), oppure la variante p.Met470Val e l'alta frequenza delle mutazioni *CFTR* di classe IV e V (28). Negli ultimi anni, con l'avvento delle strategie di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) e l'utilizzo di approcci di Whole Genome Sequencing (WGS), sono stati identificati altri geni, oltre *CFTR*, che potrebbero essere implicati nell'insorgenza di CBAVD quali *ADGRG2*, *SLC29A3*, *TGFB1* e *EDNRA* (28,29).

In circa il 30-70% delle donne, invece, si verifica incontinenza urinaria da stress, un problema importante e spesso sottovalutato (30).

Osteopenia e osteoporosi sono spesso osservate nei pazienti con FC. Diversi fattori contribuiscono allo sviluppo di malattie ossee correlate alla malattia, tra cui insufficienza pancreatica, il deficit di calcio, di vitamina D e K, ipogonadismo, uso di corticosteroidi, esacerbazioni polmonari ricorrenti e aumento del riassorbimento osseo osteoclastico. L'osteoartrite polmonare ipertrofica (HPOA) viene riportata con una prevalenza di circa il 2-7% e tende ad aumentare con l'età; mentre l'artropatia correlata alla FC si stima tra il 2 e l'8,5%. Quest'ultima può coinvolgere una o più articolazioni ed è caratterizzata da gonfiore articolare, dolore e rigidità che tipicamente si acutizzano, aggravandosi nel corso di 12-24 ore (31).

Infine, una complicanza cutanea è data dal cheratoderma palmo-plantare acquageno o la formazione delle cosiddette "rughe acquagene" sui palmi delle mani e dei piedi descritta per la prima volta negli affetti da FC

negli anni '70. La cheratodermia consiste in un'eccessiva formazione di rughe transitorie e papule bianche traslucide sui palmi delle mani dopo l'immersione in acqua che comportano prurito, bruciore, formicolio o fastidio ma che tipicamente si risolvono spontaneamente entro poche ore. Uno studio su 27 pazienti con FC ha riportato una prevalenza del 41% (32).

## I GENI MODIFICATORI NELLA FIBROSI CISTICA

La grande complessità dei fenotipi associati alla FC e la presenza di tante comorbidità correlate, ha fatto ipotizzare che i geni modificatori/modulatori del fenotipo, potessero avere un ruolo nella manifestazione clinica, soprattutto nella severità dei sintomi. I geni modificatori ad oggi identificati sono oltre 30, le loro alterazioni aiutano nella comprensione delle forme non classiche di FC; in particolare possono chiarire il coinvolgimento di organi diversi e la diversa gravità dei sintomi nei diversi pazienti. I primi geni candidati sono stati selezionati in base al loro ruolo in vie metaboliche già correlate alla malattia o a patologie simili. Tra i primi ad essere identificati: il gene *TGFB1* (Transforming Growth Factor Beta 1) modulatore della malattia respiratoria, *PPARγ* (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) modulatore del rischio di diabete-correlato alla FC; ma anche il gene *SERPINA1* (Serpina Family A Member 1) implicato nella patologia epatico-correlata alla FC e *MBL2* (Mannose Binding Lectin) che codifica per una proteina implicata nella risposta del sistema immunitario agli agenti patogeni, attività importante soprattutto nei primi anni di vita (33–35).

Gli studi di associazione (linkage) possono essere utili per l'identificazione di specifiche regioni di interesse all'interno del genoma, associate a particolari fenotipi di FC. Interessanti sono risultati anche gli studi Genome Wide Association Studies (GWAS), che hanno permesso di focalizzare l'attenzione primariamente sulla severità polmonare e l'ileo da meconio che rappresentano i sintomi più frequenti negli affetti da FC (36,37).

Uno studio del 2015 identifica alcuni geni che potrebbero essere implicati proprio nella differente severità polmonare che sviluppano i pazienti affetti da FC (38): il gene *AGTR2* codifica per il recettore di tipo II dell'angiotensina ed è implicato in numerose funzioni polmonari; si riscontra alterato in alcune condizioni patologiche come la fibrosi e l'infiammazione correlata alla FC. Il gene *SLC6A14* codifica per un trasportatore di aminoacidi neutri e cationici, e numerose varianti sono state trovate nella regione al 5' e riportate in associazione con un maggiore rischio di incorrere in ostruzioni intestinali, e in grado di modulare la severità polmonare in pazienti con infezione da *Pseudomonas aeruginosa* sotto i 18 anni d'età affetti da FC. Una rassegna del 2018 (39) riporta diverse informazioni su importanti geni modificatori:

- *MUC20* e *MUC4* svolgono un ruolo importante nel

mantenimento della pressione osmotica e nella corretta idratazione degli strati di fluido ciliare;

- *SLC9A3* codifica per una proteina di scambio sodio-idrogeno importante per la regolazione del pH e del sodio in una varietà di epitelii strettamente legati alla patologia;
- *EXOC3* codifica per una componente importante implicata nel processo di esocitosi mirata al trasporto delle vescicole dal Golgi alla membrana plasmatica;
- *CEP72* e *TPPP* svolgono un ruolo nella formazione dei microtubuli, che risultano essere alterati nelle cellule FC;
- *HLA* di classe II coinvolti nella presentazione dell'antigene e nella risposta infiammatoria correlata;
- *EHF*, un fattore di trascrizione epiteliale con importanti funzioni nella biologia delle vie aeree correlate all'infiammazione;
- *APIP* che è un mediatore di infiammazione batterica, e dell'apoptosi.

Alcuni lavori recentissimi hanno identificato numerose nuove varianti e ulteriori geni modulatori della FC. In particolare, polimorfismi riscontrati sui geni *BPIFA1* e *BPIFB1* sono stati associati alla gravità della malattia polmonare dovuta alla FC (40). Lo studio del genotipo del gene *T2R38* (che codifica per un recettore del gusto e correlato all'insorgenza di malattie nasali e infezioni delle vie respiratorie superiori) ha mostrato una correlazione positiva con la gravità della FC in pazienti FC con infezione da *Pseudomonas aeruginosa* rispetto ai controlli (41).

Con l'aumento dell'aspettativa di vita si ha anche una crescita del diabete-correlato alla FC che si attesta tra le più comuni complicanze nei pazienti affetti (colpisce infatti, circa il 25% degli adolescenti e l'80% degli adulti con età superiore ai 50 anni). Studi di associazione hanno dimostrato il coinvolgimento dei geni *TCF7L2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, e *IGF2BP2* (39).

L'ostruzione intestinale neonatale, come già detto, si verifica in circa il 20% dei pazienti con FC negli Stati Uniti, con stime che variano tra il 14% e il 21% a seconda dei dati dei registri nazionali. La patologia associata dipende certamente dalle varianti sul gene *CFTR*, ad esempio i portatori della mutazione Gly542Ter e p.Phe508del hanno un rischio maggiore di avere l'ileo da meconio. I geni candidati per la patologia intestinale sono *ADIPOR2*, *SLC4A4* e *MSRA*. Uno studio GWAS ha rivelato tre loci significativi in *SLC26A9*, *ATP12A* e *SLC6A14*, oltre a *PRSS1* (39,42).

Degno di nota e particolarmente interessante è il fenomeno della pleiotropia, ossia un fenomeno genetico per il quale un unico gene determina effetti fenotipici multipli, a prima vista anche non correlati fra di loro (43). In particolare, questo avviene per il gene *SLC26A9* che è pleiotropico sia per l'ileo da meconio sia per il danno pancreatico; *SLC9A3* è pleiotropico per l'ileo da meconio, e diverse malattie polmonari e infezioni. Infine, *SLC6A14* è pleiotropico per l'ileo da meconio, la malattia polmonare e l'età alla prima infezione da *Pseudomonas aeruginosa*.

**RAPPORTO TRA MUTAZIONI GENICHE E LA TERAPIA DI PRECISIONE**

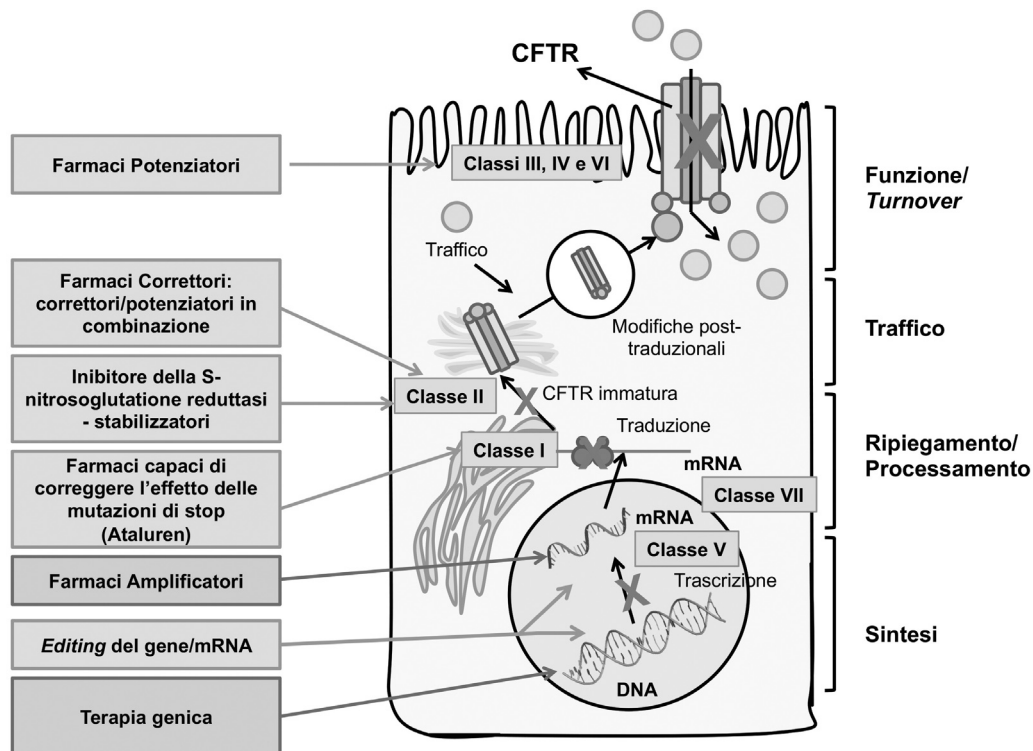
Il termine medicina di precisione identifica l'approccio multidisciplinare che, partendo dall'integrazione del dato genetico e del quadro clinico, contestualizza il percorso terapeutico al paziente.

Per identificare una alterazione a livello del DNA si utilizzano tecniche di sequenziamento di tipo Sanger (Figura 2), che rappresenta la metodica convenzionale, spesso seguita da tecnologia di seconda generazione o NGS e oggi addirittura di terza generazione (Nanopore o PacBio) che riesce a sequenziare tratti di DNA di lunghezze molto superiori rispetto alle prime due tecnologie citate. Oggi, la medicina di precisione è diventata un vero e proprio obiettivo per la cura di molte malattie umane. Conoscendo i meccanismi patogenetici alla base della malattia d'interesse, la medicina di precisione potrebbe, sempre di più, rappresentare una svolta importante permettendo lo sviluppo di terapie mirate.

La FC è una patologia ampiamente studiata, identificata già a partire dal XVIII secolo, diagnosticata dal sudore salato sulla pelle dei piccoli affetti. Solo negli

ultimi anni, però, sono state messe a punto diverse molecole note con il termine generico di "Modulatori di CFTR" che sono in grado di migliorare e incrementare la funzione di CFTR stesso (10,44,45). Questi farmaci sono stati sviluppati per trattare la FC e includono: attivatori, potenziatori e correttori. Gli attivatori di CFTR agiscono aumentando i livelli intracellulari di cAMP/cGMP, necessari per stimolare l'attività di CFTR; i potenziatori aumentano l'apertura del canale CFTR localizzato sulla superficie cellulare e infine, i correttori agiscono come "chaperons molecolari" per aumentare l'attività di CFTR sulla superficie cellulare (46,47). Nonostante i recenti progressi della ricerca, che ha portato allo sviluppo dei modulatori CFTR, solo il 50% dei pazienti affetti dalla FC è eleggibile per la terapia modulatrice in base alle mutazioni di cui sono portatori. Sulla base delle attuali linee guida della Food and Drug Administration (FDA), un numero significativo di pazienti non sono indicati per la terapia modulatrice (48). Inoltre, molte delle 2 000 mutazioni di CFTR conosciute ad oggi, sono così rare che produrre terapie e testarne l'efficacia non è un approccio fattibile a causa dei costi elevatissimi (Figura 3).

Il primo farmaco potenziatore approvato dalla FDA



**Figura 3**

Le numerose mutazioni nel gene CFTR possono essere raggruppate in classi a seconda dell'effetto che la mutazione ha nel processo di biosintesi e localizzazione della proteina CFTR. Sono in fase di sviluppo molti farmaci che agiscono su classi specifiche di mutazioni o su singole mutazioni (rettangoli in verde): Nei rettangoli blu sono mostrati approcci diversi, come ad esempio la terapia genica. Modificato da Davies et al. (rif 45).

per l'uso clinico è l'Ivacaftor (49). La somministrazione di Ivacaftor facilita l'apertura del canale ionico migliorando il passaggio degli ioni cloro e dell'acqua necessari per l'idratazione della superficie delle vie respiratorie, del pancreas, del fegato e dell'intestino. L'ottima funzionalità del farmaco è dimostrata dal test del sudore che si normalizza. In Italia, solo il 2,5% dei pazienti è portatore di una mutazione di gating. La molecola è destinata a pazienti dai 2 anni d'età portatori di determinate mutazioni di classe III (p.Gly551Asp, p.Gly1244Glu, p.Gly1349Asp, p.Gly178Arg, p.Gly551Ser, p.Ser1251Asn, p.Ser1255Pro, p.Ser549Asn, p.Ser549Arg) e classe IV (Arg117His) (50). Nel loro insieme, queste mutazioni, rappresentano circa l'8% di tutti i pazienti affetti da FC. Lumacaftor è attualmente l'unico "correttore" *CFTR* approvato dalla FDA; tuttavia, una serie di altri correttori sono in varie fasi di sviluppo (51). Il Lumacaftor può essere usato anche in combinazione con l'Ivacaftor e favorisce il raggiungimento della superficie delle cellule epiteliali da parte della proteina codificata da *CFTR*, e la formazione corretta del canale del cloro rendendolo, quindi, funzionante. L'uso combinato dei due farmaci ha dimostrato di ridurre significativamente le riacutizzazioni delle infezioni polmonari. Il Lumacaftor è indicato per i pazienti affetti di età pari o superiore ai 6 anni che sono omozigoti per la mutazione p.Phe508del (15,52). La mutazione p.Phe508del è la più frequente a livello mondiale, ma in Italia i pazienti FC omozigoti per p.Phe508del sono soltanto il 25%. Il terzo modulatore è il Tezacaftor sempre usato in combinazione con Ivacaftor; l'efficacia della combinazione è simile a quella descritta in precedenza ma presenta una maggiore tollerabilità. Il Tezacaftor è ancora in fase di approvazione da parte della agenzia regolatoria Italiana (AIFA) mentre è già stato approvato dalla FDA e dalla agenzia Europea (EMA) in pazienti con doppia mutazione p.Phe508del o con una mutazione p.Phe508del associata ad altre ulteriori mutazioni, definite a "funzione residua", 26 negli Stati Uniti e 14 in Europa; queste sono mutazioni che consentono una parziale funzionalità residua della proteina CFTR. Recentemente, (Agosto 2020), l'EMA ha approvato un nuovo farmaco denominato Trikafta, costituito da una combinazione di tre molecole: due correttori e un potenziatore per il trattamento della mutazione CFTR più diffusa al mondo (p.Phe508del). Questo nuovo modulatore potrà essere usato in pazienti di età superiore ai 12 anni. I risultati clinici sono stati molto incoraggianti con un aumento significativo della funzione polmonare (53). Il Trikafta sarà utilizzato anche per i pazienti con p.Phe508del in eterozigosi e un'altra mutazione (mutazione con funzione minima). Anche in questo caso i risultati clinici ottenuti sono stati molto incoraggianti (54).

## CONCLUSIONI

In conclusione, anche se la malattia è conosciuta da

oltre un secolo, il gene-malattia è stato identificato circa trenta anni fa e a oggi sono conosciute oltre 2 000 mutazioni che, attraverso il loro effetto pleiotropico, producono differenti effetti patologici con aspetti fenotipici anche molto diversi tra di loro, indicando così la presenza sia di una eterogeneità genetica sia una eterogeneità fenotipica, che il clinico deve considerare attentamente. Tuttavia, la molteplicità di effetti fenotipici e la presenza di comorbidità, sono ulteriormente incrementate dalla presenza di geni modificatori (circa 30) che hanno consentito di migliorare la conoscenza delle differenti manifestazioni fenotipiche di FC. Negli anni più recenti, infine, i progressi della scienza e la medicina di precisione, hanno consentito di produrre diversi tipi di farmaci che anche in combinazione tra di loro riescono a mitigare una certa percentuale delle manifestazioni della malattia, rallentando la progressione della stessa. Il raggiungimento di benefici terapeutici per la FC è oggi tale da consentire ad una percentuale di ammalati di raggiungere anche età superiori ai 50-60 anni con una accettabile qualità della vita.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## RINGRAZIAMENTI

L'Autore desidera ringraziare il Prof. Francesco Salvatore per l'aiuto ricevuto nella revisione del testo e delle figure.

## BIBLIOGRAFIA

1. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2020;109:893-9.
2. da Silva Filho LVRF, Zampoli M, Cohen-Cymbberknoh M, Kabra SK. Cystic fibrosis in low and middle-income countries (LMIC): A view from four different regions of the world. *Paediatr Respir Rev* 2020;S1526:30108-1.
3. Doull I. Cystic fibrosis 2019: Year in review. *Paediatr Respir Rev* 2020;35:95-8.
4. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373(9678):1891-904.
5. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis *Science* 1989;245:1073-80.
6. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999;79:S123-45.
7. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet* 2016;388(10059):2519-31.
8. Miller AC, Comellas AP, Hornick DB, et al. Cystic fibrosis carriers are at increased risk for a wide range of cystic fibrosis-related conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:1621-7.
9. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, et al. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002;19:575-606.
10. Scotet V, L'hostis C, Férec C. The changing epidemiology of cystic fibrosis: Incidence, survival and impact of the CFTRGene discovery. *Genes (Basel)*. 2020;11:589.

11. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 2016;27:424–33.
12. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med* 2016;4:e37–8.
13. De Boeck K, Amaral MD. Classification of CFTR mutation classes – Authors' reply. *Lancet Respir Med* 2016;4:e39.
14. Lucarelli M, Angioni A, Baffico M, et al. Consensus 2019 per l'analisi genetica in Fibrosi Cistica : presentazione del Documento. *Biochim Clin* 2020;44:397–9.
15. Harutyunyan M, Huang Y, Mun KS, et al. Personalized medicine in CF: From modulator development to therapy for cystic fibrosis patients with rare CFTR mutations. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2018;314:L529–43.
16. Ronan NJ, Elborn JS, Plant BJ. Current and emerging comorbidities in cystic fibrosis. *Press Medicale* 2017;46:e125–38.
17. Garcia B, Flume PA. Pulmonary complications of cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2019;40:804–9.
18. Lord RW, Jones AM, Webb AK, et al. Pneumothorax in cystic fibrosis: beyond the guidelines. *Paediatr Respir Rev* 2016;20:S30–3.
19. Okafor S, Kelly KM, Halderman AA. Management of sinusitis in the cystic fibrosis patient. *Immunol Allergy Clin North Am* 2020;40:371–83.
20. Munck A, Kheniche A, Alberti C, et al. Central venous thrombosis and thrombophilia in cystic fibrosis: A prospective study. *J Cyst Fibros* 2015;14:97–103.
21. Singh VK, Schwarzenberg SJ. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* 2017;Suppl 2:S70-78.
22. Somaraju URR, Solis-Moya A. Pancreatic enzyme replacement therapy for people with Cystic Fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;8:CD008227.
23. Diéguez-Castillo C, Jiménez-Luna C, Prados J, et al. State of the art in exocrine pancreatic insufficiency *Medicina (Kaunas)* 2020;56:523.
24. Doan LV, Madison LD. Cystic Fibrosis Related Diabetes. 2020. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
25. Dana J, Girard M, Debray D. Hepatic manifestations of cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2020;36:192–8.
26. Smith S, Rowbotham N, Davies G, et al. How can we relieve gastrointestinal symptoms in people with cystic fibrosis? An international qualitative survey. *BMJ Open Respir Res* 2020;7:e000614.
27. Yahiaoui Y, Jablonski M, Hubert D, et al. Renal involvement in cystic fibrosis: Diseases spectrum and clinical relevance. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:921-8.
28. de Souza DAS, Faucz FR, Pereira-Ferrari L, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology* 2018;6:127–35.
29. Bieth E, Hamdi SM, Mieussset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet* 2020;140:59–76.
30. Yang L, Ren Z, Yang B, et al. The association between variants in the CFTR gene and nonobstructive male infertility: A meta-analysis. *Andrologia* 2020;52:e13475.
31. Stahl M, Hofelder C, Kneppo C, et al. Multiple prevalent fractures in relation to macroscopic bone architecture in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2018;17:114–20.
32. Megna M, Cantelli M, Martellotta D, et al. Aquagenic wrinkling of the palms: A case report and literature review. *Dermatol Online J* 2016;22:13030.
33. Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, et al. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 2009;302:1076–83.
34. Paranjapye A, Ruffin M, Harris A, et al. Genetic variation in CFTR and modifier loci may modulate cystic fibrosis disease severity. *J Cyst Fibros* 2020;Suppl 1:10–4.
35. Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2012;7:267–82.
36. Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: The example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1214:57–69.
37. Gallati S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: Experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 2014;7:133–46.
38. Corvol H, Blackman SM, Boëlle PY, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 2015;6:8382.
39. O'Neal WK, Knowles MR. Cystic fibrosis disease modifiers: Complex genetics defines the phenotypic diversity in a monogenic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2018;19:201–22.
40. Saferali A, Tang AC, Strug LJ, et al. Immunomodulatory function of the cystic fibrosis modifier gene BPIFA1. *PLoS One* 2020;15:e0227067.
41. Castaldo A, Cernera G, Iacotucci P, et al. TAS2R38 is a novel modifier gene in patients with cystic fibrosis. *Sci Rep* 2020;10:5806.
42. Marson FAL. Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2018;24:296–308.
43. Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F, Gong J, et al. Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: Pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet* 2014;133:151–61.
44. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol* 2020;10:1662.
45. Davies G, Griesenbach U, Alton E, et al. 53 - Molecular Therapies for Cystic Fibrosis. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children (Ninth Edition)*, Elsevier, 2019: 800-811.
46. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med* 2020;8:65–124.
47. Bose SJ, Krainer G, Ng DRS, et al. Towards next generation therapies for cystic fibrosis: Folding, function and pharmacology of CFTR. *J Cyst Fibros* 2020;19:S25–32.
48. Shteinberg M, Taylor-Cousar JL. Impact of CFTR modulator use on outcomes in people with severe cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir Rev* 2020;29:190112.
49. Sermet-Gaudelus I. Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *Eur Respir Rev* 2013;22:66–71.
50. Egan ME. Cystic fibrosis transmembrane conductance receptor modulator therapy in cystic fibrosis, an update. *Curr Opin Pediatr* 2020;32:384–8.
51. Chaudary N. Triplet CFTR modulators: Future prospects for treatment of cystic fibrosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:2375–83.
52. Manfredi C, Tindall JM, Hong JS, et al. Making precision medicine personal for cystic fibrosis. *Science*. 2019;365:220.
53. Cuevas-Ocaña S, Laselva O, Avolio J, et al. The era of CFTR modulators: improvements made and remaining challenges. *Breathe* 2020;16:200016.
54. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, et al. Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med* 2019;381:1809–19.

## L'etica in medicina di laboratorio nella terza era della medicina

**Mario Plebani**

Dipartimento Didattico-Scientifico-Assistenziale Integrato (DIDAS) Servizi di Diagnostica Integrata, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università di Padova. Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Università di Padova

### ABSTRACT

#### **Ethics in laboratory medicine in the era 3 for medicine.**

Laboratory medicine, just as other areas of medicine, is obliged to adhere to high ethical standards. Many countries and professional societies have developed policies and guidance materials on ethical issues related to laboratory medicine. In particular, the International Organization for Standardization (ISO) in the accreditation standard ISO 15189:2012 "Medical laboratories – Requirements for quality and competence" has dedicated a specific section to this issue. Section 4.1.1.3 of the document, in fact, summarizes the ethical conduct expected in laboratories, including requirements for the pre-, intra- and post-analytical phases of the testing cycle. The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) has established a Task Force on Ethics (TF-E) with the aim to increase awareness among Laboratory Medicine Professionals of ethical issues and to encourage the practice of Laboratory Medicine to the highest ethical standards. Here we would like to highlight the main aspects of ethics in laboratory medicine, particularly in the context of the current era of medicine.

Come ci hanno insegnato gli antichi romani, "*Malum quidem nullum esse sine aliquo bono*", che tradotto significa "*non tutto il male viene per nuocere*". Anche questa terribile pandemia, che ha sconvolto le nostre vite, è fonte di molti insegnamenti che devono essere colti per divenire fonte di ripensamento e miglioramento. Ho subito pensato a questo *incipit*, quando Maria Stella Graziani mi ha proposto di scrivere un articolo sull'etica in medicina di laboratorio, un tema sul quale ho scritto e dibattuto molti anni fa. Ho immediatamente accettato l'invito perché in questi giorni il tema dell'etica nell'affrontare vari aspetti legati alla pandemia è emerso con grande clamore.

L'aspetto più attuale e dibattuto è l'obbligatorietà della vaccinazione per il personale che opera in sanità, che ha portato ad interrogarsi sul rapporto fra libertà e doveri. Come scrive Michele Ainis su Repubblica (3 aprile 2021) questo tema "*...non interroga però solo il diritto, bensì pure l'etica, e in generale il rapporto fra le libertà e i doveri, fra gli individui e la comunità. È giusto ritagliare gli operatori sanitari rispetto ad altri gruppi a contatto con il pubblico, come gli insegnanti o chi lavora*

*allo sportello? È giusto negare il diritto al lavoro in nome del diritto alla salute? Ed è giusto discriminare chiunque rifiuti la somministrazione del vaccino?*". Non spetta a me, specie in questo contesto, dare risposte ai quesiti che Ainis propone, ma che si sono subito collegati ad altri, quali la posizione dei medici di famiglia e degli specializzandi che hanno monetizzato la loro disponibilità a farsi carico anch'essi della campagna vaccinale. E ancora, tutti abbiamo sfiorato e cercato di evitare il dibattito sulla drammatica scelta che forzatamente si è posta nei reparti di Terapia Intensiva e Rianimazione, specialmente nel corso della "prima ondata", per decidere chi poteva essere curato e chi invece no. In effetti, il tema dell'etica in medicina si è riproposto in modo drammatico soprattutto in queste situazioni, quelle che gli anglossassoni definiscono "at the sharp end", ossia nelle situazioni più acute e intense del rapporto medico-pazienti. Nella medicina di laboratorio, il tema dell'etica non ha assunto aspetti cruenti e così esposti al pubblico quali quelli sopraccitati, ma sicuramente ha riproposto un ripensamento sul ruolo della disciplina nella moderna medicina, sui rapporti fra le

Corrispondenza a: Mario Plebani, DIDAS Servizi di Diagnostica Integrata, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università di Padova, Via Giustiniani,2 - 35128 Padova, Italy, Tel 0498212792, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 07.04.2021

Revisionato: 08.04.2021

Accettato: 08.04.2021

Pubblicato on-line: 27.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.026

sub-discipline che la compongono, e su come l'etica si declini in tematiche concrete nei laboratori clinici. Mi è piacevole, oltre che doveroso, ricordare uno dei momenti fondamentali per acquisire consapevolezza della centralità dell'etica anche in medicina di laboratorio, precisamente la costruzione dello standard internazionale per l'accreditamento dei laboratori clinici,

l'ISO 15189. Nella fase di preparazione e revisione delle varie versioni che hanno preceduto la sua pubblicazione nel 2000 (1), con un paio di colleghi più sensibili alla tematica e fra molte discussioni avvenute in giro per il mondo, riuscimmo ad inserire un allegato (Annex) su questo aspetto. L'allegato prendeva in considerazione 9 punti che riporto nella Tabella 1.

#### Tabella 1

*Aspetti etici presenti nella versione del 2000 dell'ISO 15189*

1. Principi generali: "il benessere del paziente è di primaria importanza".
2. Raccolta di informazioni: identificazione del paziente.
3. Prelievo dei campioni: consenso del paziente e attenzione nelle procedure a carattere invasivo.
4. Esecuzione delle analisi: rispetto delle procedure.
5. Refertazione: riservatezza dei dati e consegna dei referti.
6. Archiviazione e conservazione della documentazione medica: sicurezza contro smarrimento o distruzione e responsabilità legale.
7. Accesso ai documenti medici: controllo degli accessi e delle richieste.
8. Utilizzo dei campioni per scopi diversi da quelli richiesti: anonimità dei campioni.
9. Contratti finanziari: distinzione tra attività del servizio di laboratorio e interessi dei clienti.

Nella più recente versione della norma (del 2012) gli aspetti dell'etica sono stati riconosciuti di tale importanza

da essere ripresi non più in un allegato, ma in una specifica Sezione (4.1.1.3) che riporta 5 elementi (Tabella 2)

#### Tabella 2

*Aspetti etici presenti nella Sezione 4.1.1.3 dell'ISO 15189:2012*

1. Non deve esistere alcun coinvolgimento in attività che possano diminuire la confidenza nella competenza del laboratorio, l'imparzialità, l'integrità di giudizio o di operatività.
2. La direzione e il personale devono essere liberi da qualsiasi pressione o influenza commerciale, finanziaria o di altro tipo che possa interferire negativamente con la qualità dell'attività.
3. Nel caso esistano potenziali conflitti di interesse, questi devono essere dichiarati in modo chiaro e appropriato.
4. Devono esistere procedure appropriate ad assicurare che il personale rispetti i requisiti legali nel trattamento dei campioni, tessuti e resti umani.
5. Deve essere rispettata la confidenzialità delle informazioni.

La forte connotazione tecnologica della disciplina, che aveva portato negli ultimi decenni a sottovalutare il problema dell'etica e delle problematiche deontologiche, che invece sono aumentate e divenute sempre più rilevanti e complesse specialmente con la progressiva espansione dalle indagini molecolari e genetiche, viene, quindi, stemperata nello Standard Internazionale di accreditamento grazie al riconoscimento dell'importanza di una visione olistica della qualità e del legame esistente con l'etica professionale. È bene ricordare, fra l'altro che quando nel documento si parla di "ethical code", la traduzione non è riduttivamente "codice etico", ma più in generale "deontologia professionale", a sottolineare la complessità e dignità che comporta. La lettura attenta dello Standard e dei requisiti presenti, permette di mettere in luce la necessità di ottemperare a criteri qualitativi sia nella raccolta delle informazioni, dei campioni, nell'esecuzione degli esami e loro

refertazione, come pure nella loro interpretazione. La sottolineatura degli aspetti di rispetto della confidenzialità delle informazioni, dell'accesso alla documentazione, come pure della conservazione e accessibilità alla documentazione stessa è un segno del crescente valore dell'informazione di laboratorio, del passaggio da una tipologia di esami utili soprattutto per il monitoraggio delle patologie, alla loro crescente utilità per valutare il rischio di malattia ed eseguire diagnosi in soggetti asintomatici: questo passaggio richiede ancora maggiore prudenza e attenzione ai temi della riservatezza e confidenzialità dei dati e dell'informazione di laboratorio.

L'AACC (American Association for Clinical Chemistry) ha adottato un decalogo, riportato nella Tabella 3, per sensibilizzare i soci sull'importanza dell'etica nella professione che merita di essere letto e interpretato.

**Tabella 3**

*Il decalogo dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC) sui principi etici nella medicina di laboratorio.*

1. Sostieni gli standard della professionalità, sii onesto nei rapporti professionali, e mantieni elevati livelli di integrità personale.
2. Evita qualsiasi cattiva condotta scientifica e professionale, inclusi frode, fabbricazione di risultati, plagio, omissione di informazioni, e dichiarazioni false o ingannevoli.
3. Denuncia casi di operatori sanitari che incorrono in episodi di frode o inganno, o che esibiscono deficienze di carattere o professionalità tali da metter in pericolo la cura dei pazienti.
4. Mantieni un elevato livello di qualità nei prodotti delle attività professionali, incluse la validità e affidabilità dei risultati degli esami, commenti interpretativi, pubblicazioni e ricerca scientifica.
5. Rispetta la confidenzialità e riservatezza delle informazioni sanitarie delle quali si viene a conoscenza nel corso della pratica professionale, in accordo con le disposizioni legali e etiche.
6. Impegnati a migliorare continuamente la qualificazione, la conoscenza e le abilità professionali e presentale in modo accurato.
7. Promuovi la sicurezza e il benessere dei pazienti, dei dipendenti, collaboratori, della comunità e dell'ambiente.
8. Evita, o denuncia e cerca di risolvere, ogni possibile conflitto di interesse attuale e potenziale.
9. Incoraggia la discussione aperta e leale fra medici, altri operatori sanitari e amministratori sulle tematiche dell'errore in medicina, specialmente se queste informazioni influenzano il benessere dei pazienti.
10. Rispetta la legislazione vigente e contribuisci al suo cambiamento nel caso presenti aspetti contrari ai migliori interessi del paziente.

Per far conoscere e diffondere i temi dell'etica e della qualità in medicina di laboratorio, sulla scorta della versione provvisoria (era ancora una bozza) dell'ISO 15189, nel 2000 pubblicai un volume dal titolo "Etica e qualità in medicina di laboratorio: dalla ricerca dei modelli all'impegno dei professionisti" (2) che ho ripreso in mano per scrivere questo articolo. Mi ha emozionato rileggerlo per la genuinità e la ingenuità che traspaiono nel testo, e che testimoniano lo sforzo per comunicare ai colleghi della medicina di laboratorio la necessità ineludibile di ripensare al laboratorio clinico come parte fondamentale della moderna medicina, non solo come "fabbrica" di risultati ma come fonte di informazioni ispirate alla visione del brain-to-brain-loop. La rilettura del testo mi ha portato a riscoprire alcuni concetti chiave, e in particolare come il ricorso all'etica sia fondamentale per un approccio moderno e dinamico alla qualità dei servizi di laboratorio clinico nel quale il "tempio della qualità" si fonda su quattro colonne portanti: fondamento etico; metodologia scientifica; razionalità gestionale, e valorizzazione delle risorse umane. Il secondo volume che ho ripreso in mano è "Etica del laboratorio biomedico" scritto da Dario Sacchini con una mia prefazione (3). In questo libro, che nel primo capitolo ripercorre la storia e l'evoluzione del laboratorio clinico, e sottolinea con forza la complessità che lo caratterizza, la dimensione etica è strettamente legata alla qualità vista come "dovere etico, impegno che delega ogni operatore al dovere di lavorare per il meglio" (2). L'etica rappresenta sicuramente un elemento strategico, il discrimine fra due modalità di interpretare la missione dei laboratori clinici e nel distinguere chi ritiene che questa sia semplicemente legata a produrre risultati analiticamente corretti, e chi invece sostiene l'esistenza di un "contratto a tre" che lega professionisti del laboratorio, clinici e pazienti (e/o utenti) nel processo

totale dell'analisi di laboratorio (4). La visione del laboratorio come parte integrata e centrale della moderna medicina implica l'assunzione di nuove responsabilità, anche di tipo etico, da parte dei professionisti che, a loro volta necessitano di modalità e pratiche formative nuove e aggiuntive. È bene ricordare che l'IFCC ha attivato una Task Force su questo tema (Task Force on Ethics, TF-E) nella quale Martina Zaninotto partecipa a rappresentare la SIBioC. Questa Task Force si è posta quattro obiettivi: migliorare la consapevolezza delle tematiche dell'etica fra i professionisti della medicina di laboratorio; stimolare l'adesione della pratica di medicina di laboratorio ai più elevati standard etici; sviluppare linee-guida sui temi etici per le società affiliate; fornire una vetrina sui temi dell'etica alla medicina di laboratorio (<https://www.ifcc.org/taskforceethics/>).

Un ulteriore volume che ho ripreso in mano in quest'occasione è "Responsabilità ed etica professionale nella Medicina di Laboratorio" che scrivemmo con molti Colleghi del gruppo PHASE-Lab nel 2006 (5). Il tema dell'etica viene trattato soprattutto nel primo capitolo del libro, intitolato "Basi etiche e ruolo della Medicina di Laboratorio" e riprende molti dei concetti citati precedentemente e li associa ad un'analisi sulla pressione esercitata sul laboratorio clinico negli ultimi decenni. L'aggressione al mondo del laboratorio si è concretizzata nella visione dell'esame come pura "commodity" e sua progressiva mercificazione, nell'esternalizzazione sempre più frequente, e nella creazione di megastrutture scollegate dal contesto clinico. Nel volume c'è, anche, un preciso passaggio a quella che ho chiamato "sindrome di Fort Alamo" (6), ossia la decisione di molti professionisti di resistere all'aggressione rintanandosi all'interno delle mura dei laboratori e stressando elementi puramente "interni"

anche se importanti. Basti pensare alla enfaticizzazione del tema dell'incertezza puramente analitica, ai costi dei materiali e strumentazioni anziché dei reali costi produttivi, alla scarsa capacità di analizzare gli esiti clinici anziché solamente la qualità analitica. Il lavoro pubblicato su *Clinical Chemistry* nel 2007 che descriveva la Sindrome di Fort Alamo (6), ha un titolo emblematico "Laboratory medicine: value for patients is the goal", ma pochi Colleghi hanno realmente recepito la gravità della situazione e la necessità di uscire dall'assedio aumentando ancor più gli sforzi per dare reale visibilità alla centralità dell'informazione di laboratorio nella moderna medicina e stringere un solido patto di alleanza con i clinici e le rappresentanze dei pazienti/cittadini. Nell'attuale pandemia, il tema dell'etica si è riproposto con forza per i laboratori clinici soprattutto in merito ad alcuni aspetti cruciali:

- il ruolo del pubblico rispetto al privato accreditato, che si è declinato, ad esempio, nella decisione di vietare al pubblico l'esecuzione degli esami sierologici che il privato ha "venduto" a caro prezzo, e altre problematiche legate a carichi di lavoro insostenibili a carico del pubblico;
- il peso di decisioni che hanno portato al consolidamento di attività, anche di diagnostica molecolare, in megastrutture che hanno reso difficile una medicina di prossimità;
- la contrapposizione fra le posizioni settoriali di Società Scientifiche di sub-discipline (microbiologia in particolare) e l'auspicata unitarietà della professione;
- la litigiosità per la corresponsione di premialità (specialmente di tipo economico) a personale e settori coinvolti in alcune diagnostiche (tamponi) a fronte dell'impegno complessivo delle équipes;
- la comunicazione "disinvolta" di esperti o pseudo-esperti a fronte della necessità di comunicare dati certi e non ipotesi di lavoro;
- l'utilizzo di reagenti validati con procedure d'urgenza (Emergency Use Authorization EUA, negli USA) e non verificati adeguatamente nei laboratori clinici e senza che si costruisse una rete di laboratori che si prendessero cura della validazione su base di protocolli standardizzati e omogenei;
- l'exasperazione della necessità di rapidità (antigene rapido, sierologia con point-of-care) a fronte della garanzia di accuratezza dei risultati;
- la ritrattazione di lavori scientifici pubblicati anche su riviste di grande prestigio quali *New England Journal of Medicine* e *Lancet*, invita la comunità scientifica della medicina di laboratorio a valutare i risultati dei lavori di ricerca con metodo, rigore e maggiore accuratezza.

## CONCLUSIONI

Nelle conclusioni di un articolo, che ritengo sia di importanza storica sulla terza era in medicina e nei sistemi sanitari, Donald M. Berwick invita a riflettere

sull'evidenza che "*Without a new moral ethos, there will be no winners*", senza una nuova etica non vi saranno vincitori. Superata un'era basata sul dominio della professione e una seconda era nella quale era subentrata la teoria del mercato in medicina (e anche nella medicina di laboratorio) e della competizione basata sui costi, diviene necessario superare l'epoca del protezionismo (Era 1) e del riduzionismo (Era 2) per dare vita all' Era 3, ossia l'era della morale e, quindi, dell'etica.

Senza questa nuova visione etica, i sistemi sanitari dimostreranno tutta la loro debolezza e incapacità di dare risposte ai bisogni di salute delle popolazioni, come si è visto anche nel corso della pandemia COVID-19. Sono ormai troppi i quesiti ai quali la scienza non può dare risposte se non riemerge la richiesta e l'esigenza di dare risposte coerenti sugli scopi e i fini dell'azione in medicina in generale, e, nello specifico, nella medicina di laboratorio. La scienza con le sue incredibili scoperte e sviluppi pone oggi, anche nel settore della medicina di laboratorio, quesiti che interrogano nel profondo le coscienze e necessitano di una nuova e più appropriata deontologia professionale che non può essere appannaggio dei singoli ma della comunità e delle rappresentanze scientifiche delle comunità. È necessario uno sforzo collettivo ed è per questo motivo che ho scritto questo lavoro e lo dedico ai colleghi e amici della SIBioC.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. ISO/DIS 15189. Quality management in the medical laboratory. International organisation for Standardisation: Geneva 2000.
2. Plebani M. Etica e qualità in medicina di laboratorio: dalla ricerca dei modelli all'impegno dei professionisti. Torino: Centro Scientifico Editore, 2000.
3. Sacchini D. Etica del laboratorio biomedico. Roma: Società Editrice Universo, 2009
4. Wijeratne N, Benatar SR. Ethical issues in laboratory medicine. *J Clin Pathol* 2010;63:97-8.
5. Gruppo di Studio PHASE-Lab. Responsabilità ed etica professionale nella Medicina di laboratorio. Milano: Lauri edizioni, 2006.
6. Plebani M. Laboratory medicine: value for patients is the goal. *Clin Chem* 2007;53:1873-4.
7. Berwick DM. Era 3 for Medicine and Health Care. *JAMA* 2016;315:1329-30.

## Glossario di epidemiologia

Luisa Zanolla<sup>1</sup>, Maria Stella Graziani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università di Verona

<sup>2</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona

### ABSTRACT

#### Glossary of epidemiology.

The COVID-19 pandemic faces the reader of scientific papers with a variety of epidemiologic terms, often not familiar to the reader. A further problem is due to the incomplete standardization of those terms, that can assume partly different meaning in different settings. These problems can hamper the correct comprehension and interpretation of the data presented. These considerations represented the spur to formulate a glossary of the more common epidemiological terms, mainly using the COVID-19 epidemics as example, but taking into account also other infectious diseases and chronic non-infectious diseases as well. To facilitate the reading of the vast majority of papers, which are written in English, the corresponding English terms are reported.

### INTRODUZIONE

La pandemia generata dal virus SARS-CoV-2 ha generato la necessità di un confronto con una terminologia appartenente all'ambito epidemiologico, che è possibile non sia del tutto familiare a molti, ma che si ritrova quotidianamente sia nelle comunicazioni istituzionali che (a volte con grossolane imprecisioni) negli articoli della stampa quotidiana.

Si è voluto cogliere quindi questa occasione per rivedere questa terminologia, nelle varianti che si applicano alle malattie infettive, ma anche nella formulazione più generale, che si utilizza per patologie con una manifestazione clinica più protratta nel tempo o addirittura cronica.

La difficoltà nell'affrontare un linguaggio che non è familiare è ulteriormente aggravata dal fatto che le definizioni dei singoli parametri non sono spesso coincidenti tra le varie fonti, e lo stesso termine è non di rado usato con significato diverso. Per mantenere una linea coerente, in caso di ambiguità, in questo glossario ci siamo attenuti alle definizioni di *Oxford reference. A dictionary of epidemiology* (1).

Nel glossario, le definizioni sono spesso

accompagnate da esempi che si riferiscono principalmente alla pandemia in corso; altri esempi sono relativi ad altre malattie infettive o anche a malattie croniche non infettive. I parametri sono presentati in ordine di complessità crescente, prima per quanto riguarda la diffusione della malattia, poi per la mortalità.

Per facilitare l'accesso alle singole voci del glossario, in Appendice è presente una Tabella che elenca in ordine alfabetico tutte le voci in lingua italiana con accanto il termine in lingua inglese, e le corrispondenti voci in lingua inglese in ordine alfabetico con accanto il termine in lingua italiana.

### PARAMETRI CHE DESCRIVONO LA DIFFUSIONE DELLA MALATTIA

#### Morbidity (o morbilità o morbosità) (*morbidity*)

È la condizione di presenza di sintomi, o di stato di malattia (2). È rappresentata o stimata in termini di prevalenza (vedi) o di incidenza (vedi).

Il termine morbidity rappresenta un calco semantico dall'inglese "*morbidity*", ma il termine è usato in epidemiologia pressoché come sinonimo di morbosità e morbilità.

Corrispondenza a: Luisa Zanolla, Via Albere 73, 37138 Verona, E-mail [luisa.zanolla@univr.it](mailto:luisa.zanolla@univr.it)

Ricevuto: 14.01.2021

Revisionato: 24.01.2021

Accettato: 16.02.2021

Pubblicato on-line: 16.03.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.010

In medicina del lavoro e in medicina delle assicurazioni, invece, per morbilità si definisce il rapporto tra il numero di giornate di lavoro perse per una malattia e il numero di giornate lavorative previste (ossia quelle effettuate più quelle mancate a causa della malattia).

L'*Expert Committee on Health Statistics* WHO (3) puntualizzava come la morbilità possa essere misurata in tre unità: le persone ammalate, le malattie (periodi di malattia) e la durata delle malattie.

Nel caso di COVID-19, è chiaro che l'unità di misura sono le persone, ma la valutazione è molto complicata dall'elevato numero di soggetti asintomatici; parlando quindi di numero di casi (vedi) di positività della popolazione, non intendiamo il numero di soggetti infettati dal virus, che non possiamo conoscere, ma piuttosto il numero di soggetti cui è stata diagnosticata l'infezione.

### Popolazione a rischio (*population at risk*)

È la parte della popolazione che è suscettibile ad una malattia. Può essere identificata sulla base di fattori demografici, lavorativi o ambientali. Ad esempio, per la neoplasia ovarica solo i soggetti di sesso femminile costituiscono una popolazione a rischio, per una malattia professionale solo i lavoratori esposti. Nel caso di una malattia infettiva nuova, come la COVID-19, tutta la popolazione è di fatto considerata a rischio.

### Definizione di caso (*case definition*)

L'insieme di criteri utilizzati per definire che una persona presenta una particolare malattia.

Nei riguardi di COVID-19 la definizione internazionale di "caso" prevede che venga considerato "caso confermato" una persona con verifica molecolare della presenza del virus nelle cellule del soggetto, a prescindere dalla presenza di sintomi e segni (4). Ciò implica una sottostima del numero, ed una sua dipendenza dal numero di tamponi effettuati.

### Numero di casi (*frequency count*)

È l'informazione più semplice che viene fornita sui soggetti che presentano malattia, ed è rappresentata dal semplice conteggio dei casi per una data area ed un dato intervallo temporale.

Per COVID-19, il Ministero della Salute - Dipartimento della Protezione Civile, comunica quotidianamente il numero totale (aggregato) di test positivi in ogni Provincia d'Italia: sulla pagina della Protezione Civile (5) il numero di "nuovi positivi", riportato con cadenza quotidiana, rappresenta il numero grezzo di casi.

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) raccoglie quotidianamente da Regioni e Province Autonome i dati individuali sui casi di infezione da SARS-CoV-2, comprensivi di dati microbiologici, informazioni sullo stato clinico e comorbidità. Il dato del numero grezzo di casi è riportato con cadenza bisettimanale sulla pagina

di EpiCentro (6), sia per gli ultimi 30 giorni che dall'inizio della pandemia.

Eventuali discrepanze temporali tra i dati delle due fonti possono essere legate alla diversità di tempo necessaria a raccogliere e verificare dati individuali, rispetto alla raccolta di dati aggregati.

Dato che in entrambi i casi si tratta di nuovi casi, di fatto si tratta di un parametro di incidenza (vedi). È facilmente intuibile come il numero assoluto di casi risulti scarsamente informativo se non viene rapportato alla numerosità e alla composizione della popolazione a rischio (vedi).

### Incidenza (*incidence*)

È la misura di quanti nuovi casi di una malattia compaiono in un definito intervallo temporale. Può essere definita come rischio incidente (vedi) o come tasso di incidenza (vedi).

### Rischio incidente (o rischio assoluto o incidenza cumulativa) (*incidence risk o incidence proportion*)

È un parametro di incidenza (vedi) costituito dal rapporto tra il numero di nuovi casi di malattia osservati in un determinato intervallo di tempo e il numero di esposti a rischio (cioè persone a rischio di ammalarsi) all'inizio del periodo di tempo considerato:

$$\frac{\text{numero di nuovi casi di malattia in un intervallo di tempo definito}}{\text{numero di persone a rischio all'inizio dell'intervallo}} \times 10^n$$

Il fattore moltiplicativo (costante di convenienza)  $10^n$  compare poiché il risultato di questo rapporto è una proporzione: per renderla più leggibile si moltiplica per una numerosità che renda il dato interpretabile, come 1 000 (cioè  $10^3$ , quindi  $n=3$ ) o 10 000 ( $10^4$ ,  $n=4$ ).

Il rischio incidente rappresenta la probabilità di contrarre la malattia. Si tratta di una proporzione, perché il numero che compare al numeratore rappresenta un sottoinsieme di quello al denominatore, per cui il valore del rapporto può andare da 0 a 1 (o da 0 a 100% in forma percentuale).

L'uso del rischio incidente rapporta il numero di casi alla popolazione a rischio. Partendo dai dati, aggiornati quotidianamente, del "*Coronavirus Resource Center*" della *Johns Hopkins University* (JHU) (7), considerando solo il numero grezzo, ad esempio, se al 24 novembre l'Italia ha 1 431 795 casi totali (dall'inizio della pandemia) e il Belgio 559 902, il confronto sarebbe con evidenza a svantaggio dell'Italia; ma l'Italia ha 60 461 826 abitanti e il Belgio 11 609 980; nel caso di COVID 19 tutta la popolazione può venire considerata a rischio, per cui il rischio incidente è 23,68 per 1 000 abitanti per l'Italia e 48,22 per il Belgio.

Considerando malattie non infettive, il Progetto Cuore dell'ISS riporta 51 874 nuovi eventi coronarici ad un anno, per 19 575 094 soggetti di sesso maschile con

età tra 25 e 84 anni (8); il rischio incidente risulta:

$$\frac{51\,874}{19\,575\,094} \times 10^5 = 265$$

pari quindi a 265,0 per 100 000 abitanti per gli uomini, mentre è riportato pari a 127,4 per le donne.

Sempre il Progetto Cuore riporta il tasso di attacco (vedi) per malattie cardiache e cerebrovascolari sul periodo di un anno, per 100 000 persone (9); la definizione di tasso di attacco è diversa da quella usuale, in quanto lo distingue dal rischio incidente perché vengono conteggiate anche le recidive di eventi cardiovascolari (10). Si tratta di un uso non tipico del termine tasso di attacco (1). In ogni caso, i valori di tasso di attacco per eventi coronarici sono pari a 339 per 100.000 per gli uomini e 95 per le donne; è evidente come il numero sia più alto del rischio incidente per nuovi eventi coronarici, essendo aumentato del numero delle recidive.

### Tasso di attacco (*attack rate*)

Nel contesto di un'epidemia viene usata la denominazione di tasso d'attacco per il rischio incidente (vedi): può essere considerato un caso particolare di incidenza, quando l'esposizione al determinante (o ai determinanti) di malattia è avvenuta per breve durata, e di solito su popolazioni chiuse, o ben definite e a numerosità limitata. Si tratta quasi sempre di focolai di malattia "a sorgente comune", ossia nei quali tutti i casi di malattia hanno avuto origine da un'unica esposizione (ad esempio infezioni, avvelenamenti, esposizione a radiazioni, tossinfezioni alimentari) (11).

### Tasso di attacco secondario (*secondary attack rate*)

Viene calcolato per documentare la differenza tra la trasmissione di una malattia nella comunità rispetto alla trasmissione in una casa, in una baracca, o comunque in un gruppo chiuso. Si stima come:

$$\frac{\text{numero di casi tra i contatti dei casi primari}}{\text{numero dei contatti}} \times 10^n$$

Per questo tipo di tasso  $10^n$  è di solito 100. Benché si parli di tasso, si tratta di una proporzione. In situazioni diverse da COVID-19, in cui possono esistere individui immuni (per vaccinazione o per esposizione precedente), solo il numero dei contatti suscettibili va conteggiato.

In una serie di *case-reports* di eventi di contagi di COVID-19 (12) viene descritta la situazione di uno chalet francese nell'Alta Savoia in cui, nelle prime fasi dell'epidemia, undici persone venivano in contatto con un paziente contagiato, di ritorno dalla Cina; di queste persone, cinque risultarono successivamente infette.

Il tasso di attacco secondario è quindi:

$$\frac{5}{11} \times 10^2 = 45,5\%$$

In una recente metanalisi (13) su 54 studi, che arruolavano complessivamente 77 758 partecipanti, il tasso di attacco secondario di COVID-19 risultava del 18% quando il caso indice era sintomatico, ma soltanto dello 0,7% quando il caso indice era asintomatico.

### Tasso di incidenza (o tasso grezzo di incidenza o densità dell'incidenza) (*incidence rate o person time rate o incidence density*)

È un parametro di incidenza (vedi) che ha sempre al numeratore il numero di nuovi casi di malattia in un dato intervallo di tempo, ma al denominatore gli esposti a rischio sono espressi come somma dei tempi a rischio per ciascuna delle persone considerate:

$$\frac{\text{numero di nuovi casi di malattia in un intervallo di tempo definito}}{\text{somma del tempo a rischio per tutte le persone seguite}} \times 10^n$$

In pratica ciascun individuo che è seguito per un'unità di tempo, per esempio per 1 mese o per 1 anno, rappresenta 1 persona-mese o 1 persona-anno. Con questo calcolo, 10 persone-anno possono essere il monitoraggio di 10 pazienti seguiti per 1 anno o di 5 pazienti seguiti per 2 anni o da 2 pazienti seguiti uno per 6 e l'altro per 4 anni. Questo tipo di conteggio consente di tener conto di ingressi scaglionati nel tempo e di individui il cui tempo di osservazione sia più breve di quello previsto, perché persi al monitoraggio o per altra malattia (rischio competitivo). Un limite di questo calcolo è costituito dall'assunzione implicita che il rischio di ammalare sia costante nel tempo, il che può essere sostenibile per una malattia a durata breve, più problematico per patologie croniche.

Un'espressione del tipo "1 000 persone-anno" è comunemente usata in epidemiologia, ma meno comprensibile nel linguaggio comune; può essere espressa come "1 000 persone per anno".

I valori di tasso di incidenza possono variare tra zero e infinito. Se il periodo di osservazione è l'anno, si parla di tasso di incidenza annuale. Il tasso di incidenza rappresenta la velocità con cui la malattia si manifesta.

Data la difficoltà di misurare con precisione la variabile al denominatore, spesso la si approssima con il prodotto della numerosità media della popolazione per la durata del periodo; l'approssimazione è ragionevolmente accurata se la dimensione della popolazione è stabile e il tasso di incidenza è basso.

Per COVID-19, esempi di questa approssimazione sono i valori di tasso di incidenza riportati dalla JHU (7): il numero di casi è infatti rapportato alla numerosità della popolazione. Anche l'*European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) riporta dati come

"incidence rate" (14), rapportato a 100 000 abitanti.

Occorre puntualizzare che per alcuni epidemiologi il termine "tasso" (*rate*) si applica solo alle misure che, come nella definizione "classica" di tasso di incidenza, sono rapportate ad una misura per unità di tempo. Molti epidemiologi tuttavia usano il termine "tasso" in senso più ampio, riferendosi a proporzioni con un denominatore costituito da un conteggio di soggetti o di casi.

L'utilità della misura persone-anno come denominatore risulta evidente nell'analisi della *Emerging Risk Factors Collaboration* recentemente pubblicata (15), un consorzio di studi prospettici di coorte sui fattori di rischio cardiovascolare. La durata del monitoraggio nei 21 studi considerati era variabile tra un minimo di 4 anni ed un massimo di 34 anni: sarebbe stato fuorviante dividere gli eventi per il numero di persone a rischio, anche all'interno del singolo studio: il rischio incidente sarebbe risultato su intervalli temporali di durata variabile. Gli eventi coronarici erano 5 078, i pazienti arruolati 162 036, le persone-anno 1 629 450. Il tasso di incidenza era quindi:

$$\frac{5\,078}{1\,629\,450} \times 1\,000 = 3,12$$

per persona-anno. Data l'assunzione che il rischio sia costante nel tempo, e la durata molto lunga del monitoraggio, in questo caso la stima di rischio è stata utilizzata solo su una scala relativa, confrontandola a seconda della presenza o dell'assenza dei fattori di rischio.

### Rapporto del tasso di incidenza (*incidence rate ratio*)

È il rapporto tra il tasso di incidenza tra due gruppi. Può servire a valutare l'effetto sul tasso di incidenza di un fattore di rischio (o protettivo), rapportandolo al valore in assenza di tale fattore.

La presenza dell'epidemia di COVID-19 come fattore di rischio per riduzione degli interventi tempestivi di rivascularizzazione coronarica è stato valutato nei dati della regione Campania (16). Il tasso di incidenza di interventi percutanei nelle quattro settimane precedenti la dichiarazione dell'epidemia era di 178 per 100 000 abitanti, ma si riduceva a 120 nelle quattro settimane successive. Il rapporto del tasso di incidenza era quindi:

$$\frac{120}{178} = 0,674$$

indicando una riduzione del 32,6% (100-67,4%) delle procedure percutanee urgenti dopo l'esordio dell'epidemia.

### Prevalenza (*prevalence rate*)

La prevalenza si usa quando invece della velocità di

diffusione di una malattia (rappresentata dall'incidenza), l'informazione di interesse è la "fotografia" della situazione in un dato momento. È il numero totale di casi in un momento preciso o in un intervallo molto limitato, rapportato al numero degli esposti a rischio nello stesso momento o nel punto centrale dell'intervallo temporale considerato:

$$\frac{\text{numero di casi di malattia nuovi e preesistenti in un dato momento}}{\text{numero degli esposti a rischio nello stesso momento (o a metà del periodo)}} \times 10^n$$

Il valore di  $10^n$  è di solito 1 o 100.

La prevalenza dipende sia dall'incidenza che dalla durata della malattia. Una bassa prevalenza può derivare da bassa incidenza, da un processo morboso rapidamente fatale o da una guarigione rapida.

Per la COVID-19, quando vengono riportati dalla Protezione Civile gli "attualmente positivi" (5) o dalla JHU i "casi attivi" (7) si tratta del numeratore di un dato di prevalenza; manca però l'informazione sugli esposti a rischio nello stesso intervallo temporale.

La popolazione italiana alla fine del 2019 era secondo l'ISTAT di 59 641 488; poiché il numero cumulativo di casi di COVID-19 al 20 dicembre 2020 era di 1 953 185 (7), la prevalenza nell'arco del 2020 risultava:

$$\frac{1\,953\,185}{59\,641\,488} \times 10^5 = 3\,274,9$$

quindi circa 3 275 per 100 000 abitanti.

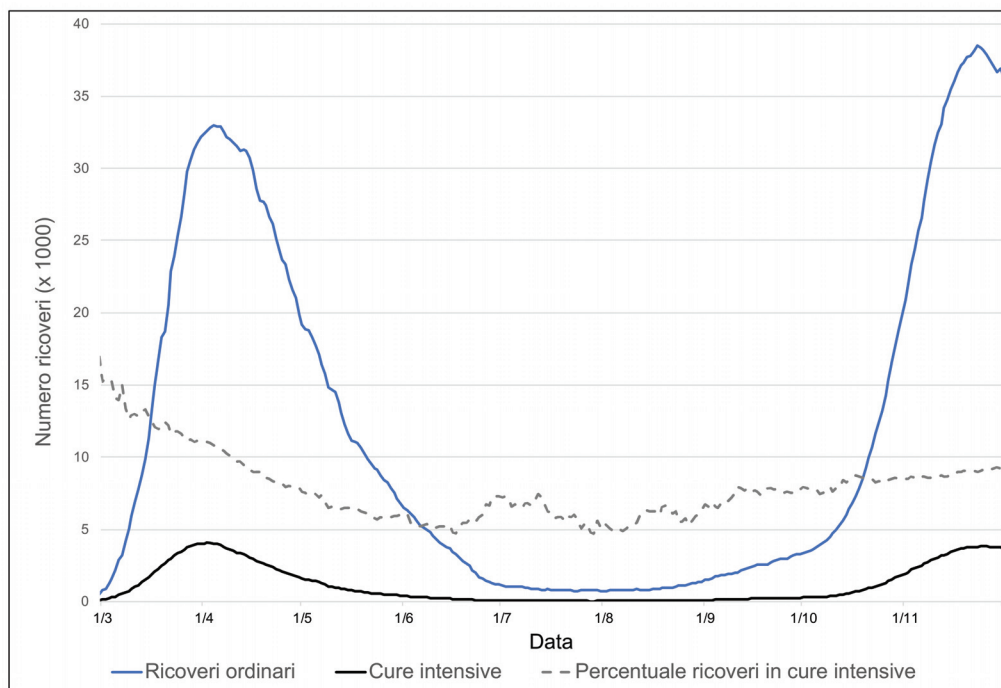
Si tende ad usare la prevalenza piuttosto che l'incidenza per le patologie croniche, come cardiopatia ischemica o diabete, per le quali è difficile definire una data di esordio e che hanno lunga durata. Il sito del Ministero della Salute riporta la prevalenza di infarto del miocardio (17) nel 1998 e nel 2008: nei soggetti di sesso maschile tra 35 e 74 anni la prevalenza aumenta dal 2,2% al 2,7%. Questa variazione non implica necessariamente un incremento dell'incidenza della patologia, ma può essere presente ove l'incidenza si riduca ma la sopravvivenza dopo infarto aumenti.

### Tasso di ospedalizzazione (*hospitalization rate*)

È una informazione importante per la gestione dell'epidemia. Si considera come ospedalizzazione il numero di individui ricoverati, indipendentemente dal regime di ricovero e dal numero di ricoveri. Si calcola come:

$$\frac{\text{numero di individui ricoverati in un intervallo di tempo}}{\text{numero di persone afferenti all'area nell'intervallo di tempo}} \times 10^5$$

Può essere di interesse conteggiare separatamente i ricoveri in degenza ordinaria da quelli in cure intensive. La rappresentazione grafica dei numeri in Italia (Figura 1), fonte ECDC (18), evidenzia come il ricovero in terapia intensiva sia meno frequente nella seconda ondata della



**Figura 1**

*Andamento temporale dei ricoveri ospedalieri per COVID-19, in degenza ordinaria ed in terapia intensiva.*

pandemia, con percentuali di ricovero in cure intensive che superavano il 15% dei ricoveri nella prima ondata, mentre restano al di sotto del 10% nella seconda.

## PARAMETRI DI DIFFUSIONE DELLA MALATTIA USATI SOLO PER LE MALATTIE INFETTIVE

### Numero di riproduzione effettivo, o $R_t$ (*effective reproduction number o infection transmission parameter*)

Citato anche come "indice di trasmissione nazionale" o "numero di riproduzione netto" (19), ma anche come "trasmissibilità" (20), è un parametro che riguarda la diffusione di malattie infettive, del quale si è molto parlato durante l'epidemia da COVID-19.  $R_t$  è il numero di riproduzione al tempo  $t$ , cioè il numero medio di casi secondari generati da un singolo individuo infetto, se le condizioni generali rimangono stabili (21).  $R_t$  è funzione della probabilità di trasmissione per singolo contatto tra una persona infetta ed una suscettibile, del numero dei contatti della persona infetta e della durata dell'infettività. L'infezione nei casi secondari compare dopo un intervallo temporale dall'infezione nel caso indice denominato tempo di generazione. Tuttavia, il tempo dell'infezione tipicamente non è conoscibile; si approssima quindi il tempo di generazione con l'intervallo seriale, che è il tempo tra l'esordio dei sintomi nel caso indice e l'esordio dei sintomi nei casi da esso infettati. Tale approssimazione, però, può portare al paradosso di un intervallo seriale negativo nel caso di COVID 19, dove la trasmissione dell'infezione avviene

prima dei sintomi, rendendo impropria l'approssimazione in alcuni contesti, con errori di stima di  $R_t$  (22).

Occorre avere ben chiaro che il calcolo di  $R_t$  rappresenta una stima secondo un modello probabilistico, con assunzioni in parte non documentabili; i dati immessi sono costituiti dal numero di casi e dall'intervallo temporale tra la comparsa dei sintomi nel caso indice e nei casi secondari. I casi asintomatici non vengono considerati nel calcolo di  $R_t$ , in quanto la loro identificazione è funzione del numero di tamponi effettuati e non della trasmissibilità del virus. Essendo l' $R_t$  una stima statistica, il dato è riportato con intervallo di confidenza, come ad esempio nei report del Ministero della Salute (23).

Il metodo più utilizzato di calcolo è il programma EpiEstim, sviluppato dall'*Imperial College* di Londra (24); viene usato anche dalla Fondazione Bruno Kessler per calcolare i valori di  $R_t$  per l'ISS (25), basandosi anche su dati sui flussi interregionali e internazionali non a disposizione del pubblico.

### Numero di riproduzione di base o $R_0$ (*basic reproduction number*)

Analogo a  $R_t$ , con il quale non deve essere confuso,  $R_0$  è il numero medio di infezioni trasmesse da ogni individuo infetto ad inizio epidemia, in una fase in cui normalmente non sono effettuati specifici interventi (farmacologici e no) per il controllo del fenomeno infettivo. Questo parametro misura quindi la potenziale trasmissibilità di una malattia infettiva o parassitaria. Il valore viene in genere riportato come stima puntuale o

intervallare, e proposto all'interpretazione in una forma sostanzialmente dicotomica, descrivendo cioè che per valori  $>1$  ci si attende che la malattia si diffonda, mentre per valori inferiori vada ad esaurirsi e a terminare.

Il valore dell' $R_0$  è stato stimato per diverse epidemie e ad esempio è stato calcolato un valore tra 0,9 e 2,1 nelle epidemie influenzali stagionali, tra 0,19 e 1,8 per la SARS (26), tra 1,4 e 2,8 nell'influenza spagnola del 1918, tra 3 e 5 nel vaiolo, tra 10 e 12 nella parotite, tra 12 e 18 nel morbillo (27).

Per la COVID-19 le stime di  $R_0$  sono estremamente variabili; sono numerosi i fattori che possono rendere ragione di questa eterogeneità di valori: la variabilità delle risorse sanitarie, degli interventi, delle interazioni tra la popolazione, oltre alla differenza nei modelli utilizzati per la stima di  $R_0$ . A causa di tale variabilità,  $R_0$  è interpretato come un parametro stimato localmente, e i valori non sono proiettabili su altri ambiti. Il valore stimato inizialmente sulla casistica di Wuhan era di 2,2 (28); le stime medie variano tra 1,95 e 6,47, con limiti dell'intervallo di confidenza tra 1,4 e 8,9 (29). Una metanalisi sui dati riportati dalle casistiche cinesi ha stimato un  $R_0$  di 3,32 (intervallo di confidenza 2,81-3,82) (30). Nella casistica in Lombardia, sono stati stimati valori tra 2,43 a Pavia e 3,09 a Lodi (29).

$R_0$  può essere usato per stimare la soglia della cosiddetta immunità di gregge, cioè la situazione in cui il numero di individui immuni alla malattia, o per immunizzazione naturale o per vaccinazione, ne preclude la diffusione. Il modello matematico più semplice prevede che:

$$1 - \frac{1}{R_0}$$

per cui, dal valore di  $R_0$  stimato di 2,5 (31), la soglia di immunità di gregge è intorno al 60% almeno.

I parametri descritti,  $R_t$  ed  $R_0$  hanno quindi alcune limitazioni molto problematiche negli assunti che li sostengono. Nonostante ciò, la loro applicazione ad epidemie precedenti, per le quali sono disponibili dati completi, ha dimostrato un buon adattamento dei dati previsti ai dati reali. Ciò si è confermato anche in una stima effettuata sui dati italiani nella prima fase dell'epidemia (29).

## ALTRE MISURE MENO USUALI

### Tempo di raddoppio dei casi (*doubling time of confirmed cases*)

È il numero di giorni necessari per un raddoppio del numero dei casi rispetto ad un dato giorno; il calcolo del tempo al raddoppio sottintende una crescita esponenziale del numero di casi. Il valore per COVID-19 è riportato per tutte le nazioni dal sito *Our World in Data*, condotto da ricercatori dell'Università di Oxford (32): per l'Italia il valore al 25 novembre risultava 30,05 giorni, sensibilmente aumentato rispetto ai 16,76 giorni del 31

ottobre, prima delle misure restrittive. All'esordio dell'epidemia, l'8 marzo, il valore era di 2,94 giorni.

### Tasso di notifica dei casi (*case notification rate*)

Data la particolarità di COVID-19, costituita dalla elevata percentuale di casi asintomatici, è difficile, se non impossibile, la valutazione del numero reale di casi. La pagina di Epicentro (6) riporta la percentuale di asintomatici su oltre 700 000 casi, e secondo la classe di età la percentuale oscilla tra il 60 ed il 75%. Diviene allora interessante conoscere almeno il tasso di notifica dei casi, che rappresenta il numero di casi identificato secondo criteri prefissati di definizione di caso (vedi), ed è definito come:

$$\frac{\text{numero di casi notificati}}{\text{numero di abitanti dell'area}} \times 10^n$$

Tale parametro è riportato con cadenza bisettimanale dall'ECDC (33). Una rappresentazione grafica dei valori per l'Italia riportati su tale database (Figura 2A) evidenzia però un problema di questo indicatore nel caso di COVID-19. L'aumento dei casi notificati nei mesi autunnali del 2020 sembra eccedere di gran lunga quello osservato all'esordio della pandemia. Poiché come casi notificati sono considerati solo quelli confermati dall'esecuzione di un tampone, al crescere del numero di tamponi effettuati cresce il numero di asintomatici identificati come casi; il fenomeno diviene comprensibile se si osserva l'andamento del numero di tamponi effettuati nello stesso arco temporale (Figura 2B), da cui la difficoltà di individuare con certezza l'entità di un effettivo aumento del numero di casi. I dati sono ricavati da *European Surveillance System* (TESSy), che include sia i test molecolari che i test antigenici.

### Percentuale di tamponi positivi (*percentage of positive specimens*)

È un altro parametro utilizzato nella definizione della diffusione dell'infezione (20), che tenta di rendere la stima indipendente dal numero di tamponi effettuati. Bisogna però distinguere la percentuale di positività dei test:

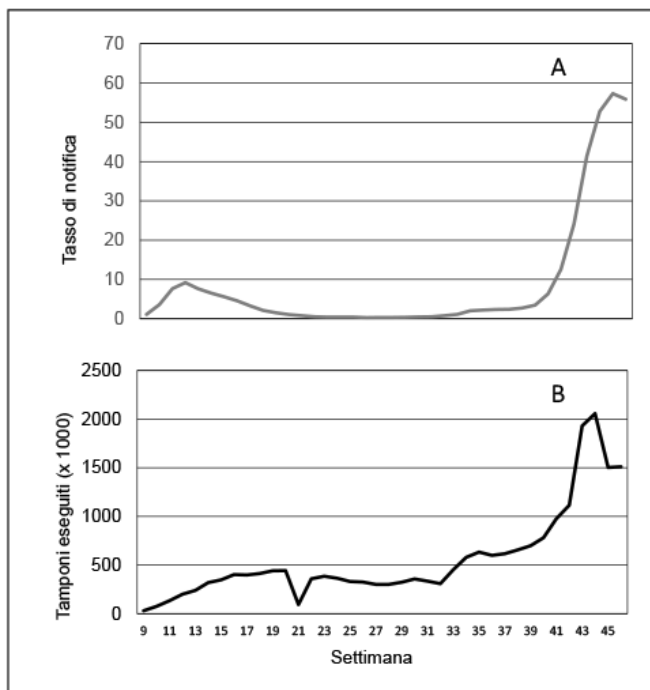
$$\frac{\text{numero di tamponi positivi}}{\text{numero totale di tamponi eseguiti}} \times 10^2$$

dalla positività dei nuovi soggetti sottoposti a test:

$$\frac{\text{numero di nuovi soggetti risultati positivi}}{\text{numero totale di nuovi soggetti sottoposti a tampone}} \times 10^2$$

Nei primi mesi della pandemia l'esecuzione di tamponi era prevalentemente effettuata in soggetti sintomatici, e ripetuta negli stessi per monitorare l'andamento dell'infezione, per cui la percentuale di positività dei test era elevata, ma non interpretabile come numero di nuovi soggetti risultati positivi.

In uno studio di coorte condotto sui pazienti positivi



**Figura 2**

Andamento temporale del tasso di notifica settimanale nel 2020 dei casi di COVID 19 (pannello A) e del numero di tamponi eseguiti (pannello B)

per SARS-CoV-2 nella provincia di Reggio Emilia (34) viene riportato il numero di soggetti con test positivi e rapportato al numero di soggetti sottoposti a test:

$$\frac{2653}{4551} \times 10^2 = 58,3\%$$

Ovviamente anche questo parametro risente dei criteri con cui si pone indicazione all'esecuzione del test.

## PARAMETRI CHE DESCRIVONO LA MORTALITÀ

In una malattia che causa un numero elevato di decessi, come COVID-19, vi è interesse per i parametri che descrivono il fenomeno, aiutando ad interpretarlo.

### Mortalità

La mortalità è descritta da una serie di parametri che derivano dal numero di decessi causati da una condizione patologica (2); può sembrare una misura che non dà adito a problemi interpretativi, ma questo è vero (anche se solo in parte) soltanto per la mortalità per tutte le cause. Nel caso di COVID 19, in particolare, occorre considerare che non sono conteggiati dalla Sorveglianza ISS i pazienti deceduti per i quali il Medico curante formula una diagnosi clinica di COVID-19, non confermata dal tampone, oltre a quelli non identificati come COVID-19. Anche nel confronto di dati internazionali vi sono differenze di metodo: i dati del Canada, ad esempio, attribuiscono a COVID 19 tutte le

morti di pazienti con tampone positivo; come l'Italia, anche i Paesi Bassi conteggiano solo i casi con sintomi suggestivi per COVID-19 e con positività del tampone, per cui risultano documentati prevalentemente decessi ospedalieri, mentre Francia e Germania non prevedono la conferma della positività del tampone (35).

### Numero di morti (*frequency count*)

Il numero (grezzo) di morti attribuiti a COVID-19 non fornisce una visione dell'andamento del fenomeno. Come per il numero di casi, anche il numero di morti diviene più informativo esprimendolo in rapporto alla popolazione a rischio come tasso di mortalità (vedi).

La pagina della Protezione Civile (5) riporta quotidianamente il numero di morti COVID-19.

### Tasso (grezzo) di mortalità (*crude death rate*)

Viene calcolato a partire dal numero dei morti. Per un definito intervallo di tempo è:

$$\frac{\text{numero di morti nell'intervallo di tempo considerato}}{\text{numerosità della popolazione a metà dell'intervallo di tempo considerato}} \times 10^n$$

Per il tasso grezzo di mortalità  $10^n$  è usualmente 1 000 o 100 000. In questo caso, benché il parametro sia denominato tasso, non si ha al denominatore una misura di pazienti mese o pazienti-anno, ma una numerosità, che per tener conto della durata dell'intervallo temporale, viene stimata alla metà di questo.

Il tasso grezzo di mortalità per COVID-19 per milione

di abitanti riportato da *Our World in Data* è per l'Italia 887,78 al 28 novembre (36), uno dei più alti al mondo, ma inferiore al valore di 1401,51 del Belgio. Dato che vengono considerati in questo calcolo solo i morti classificati come caso COVID-19, si tratta in effetti di un tasso di mortalità causa-specifica (vedi).

### Tasso di mortalità causa-specifica (*cause-specific death rate*)

È un parametro di mortalità di maggior interesse, quando si valuta il numero di eventi attribuibili ad una condizione patologica:

$$\frac{\text{numero di morti attribuiti ad una malattia nell'intervallo di tempo considerato}}{\text{numerosità della popolazione a metà dell'intervallo di tempo considerato}} \times 10^5$$

Considerando il numero di 52 850 morti indicato al 27 novembre dalla Protezione Civile (5) e la numerosità della popolazione italiana di 60 359 546 utilizzata dall'ECDC per il calcolo (33), il tasso di mortalità causa-specifica per la COVID-19 risulta essere:

$$\frac{52\,850}{60\,359\,546} \times 10^5 = 87,56$$

per 100 000 abitanti. Questa stima risente ovviamente delle limitazioni nel calcolo del numero di morti attribuibili a COVID-19.

### Tasso di mortalità specifico per età (*age-specific mortality rate*)

È un tasso di mortalità rilevato in individui di una data fascia di età.

Ad esempio, nella fascia di età tra 80 e 89 anni risultano nel report ISS dell'8 dicembre (37) 24 501 morti. Dai dati ISTAT la popolazione in questa fascia di età è di 3 647 476 individui, per cui il tasso di mortalità specifico per età è:

$$\frac{24\,501}{3\,647\,476} \times 10^5 = 671,7$$

per 100 000 abitanti.

### Tasso standardizzato di mortalità (*adjusted mortality rate*)

Aggiustamento del tasso (grezzo) di mortalità mediante standardizzazione (vedi) che può essere per età, per sesso, o per altre covariate di interesse. La standardizzazione permette di confrontare popolazioni che hanno distribuzione per età, o sesso (o altre covariate) tra loro diverse.

### Standardizzazione

Metodo di aggiustamento per una covariata suscettibile di influenzare un tasso; la standardizzazione più comunemente usata è per età o per sesso, ma

possono essere aggiustati mediante standardizzazione risultati in popolazioni che differiscano per occupazione, istruzione, religione, abitudini alimentari e altri parametri.

Non solo il tasso di mortalità, ma anche il tasso di incidenza (vedi) e il tasso di ospedalizzazione (vedi) possono essere standardizzati.

Il metodo di standardizzazione diretto per età è quello più utilizzato (anche se non il solo aggiustamento possibile). Si considerano due popolazioni che si intendono confrontare; il metodo (Tabella 1A) consiste nel calcolare i tassi grezzi per ogni specifico gruppo di età ( $c=b/a$ ); il rapporto tra la somma del numero di morti e la numerosità totale della popolazione  $C=B/A$  corrisponde al tasso grezzo totale. Occorre a questo punto definire una popolazione di riferimento su cui standardizzare i dati, che può essere una delle popolazioni considerate, l'insieme delle due o la popolazione di uno stato. Per ciascuna classe di età si calcola il numero atteso di morti ( $e$ ), moltiplicando la numerosità della popolazione di riferimento per il tasso grezzo di mortalità in quella classe di età ( $e=dx$ ). Sommando il numero atteso di morti ( $E$ ) e dividendolo per la numerosità totale della popolazione di riferimento ( $D$ ) si ottiene il tasso standardizzato di mortalità, cioè il tasso che si avrebbe se la composizione della popolazione nelle due popolazioni studiate fosse uguale a quella della popolazione di riferimento; questo parametro consente ad esempio il confronto tra regioni con diversa distribuzione di età.

Per COVID-19 si è molto discusso se una diversa composizione della popolazione possa sostenere le differenze di mortalità, anche nel caso delle regioni italiane. Consideriamo, ad esempio, che secondo i dati ISTAT la Liguria ha il 28,4% di ultrasessantacinquenni, mentre il Trentino Alto-Adige ne ha il 20,9%. L'ISTAT ha elaborato il numero di decessi per COVID per regione (38), esprimendolo in forma di tasso standardizzato di mortalità, rapportandolo alla Popolazione Italiana al Censimento del 2011. A partire dal numero di morti COVID riportati nello stesso documento, e dividendo per la numerosità della popolazione in quella regione al 1° gennaio 2020, corretta per la percentuale di popolazione valutata nel report (38), il tasso grezzo per 100 000 abitanti risultava 79,3 per la Liguria, più elevato del 66,5 del Trentino-Alto Adige. La standardizzazione diretta per età operata dall'ISTAT riduceva il tasso della Liguria a 51,3, più basso del 57,2 del Trentino Alto-Adige, il che consente un confronto al netto della differente distribuzione di classi di età.

Quando non siano disponibili i tassi specifici per età di una popolazione di interesse, ma solo il tasso di mortalità per classe di età (o altra covariata) della popolazione di riferimento, può essere applicato il metodo di standardizzazione indiretto (Tabella 1B).

Si considera il tasso di mortalità per classe di età in una popolazione di riferimento ( $r$ ); si calcola il numero atteso di morti ( $e$ ) per ciascuna classe di età, moltiplicando la numerosità di quella classe di età nella popolazione per il tasso di mortalità della popolazione di riferimento ( $e=axr$ ). La somma del numero di morti attesi

Tabella 1A

Metodo di standardizzazione diretto.

Classi di età	Numerosità popolazione 1 (a <sub>1</sub> )	N° morti nella classe di età (b <sub>1</sub> )	Tasso mortalità per classe di età (c <sub>1</sub> )		Numerosità popolazione 2 (a <sub>2</sub> )	N° morti nella classe di età (b <sub>2</sub> )	Tasso di mortalità per classe di età (c <sub>2</sub> )
0-9							
10-19							
20-29							
...							
Somma	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>		A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>
			↓				↓
Classi di età	Numerosità popolazione di riferimento (d)	Tasso mortalità per classe di età (c <sub>1</sub> )	N° morti attesi per classe di età (e <sub>1</sub> )		Numerosità popolazione di riferimento (d)	Tasso di mortalità per classe di età (c <sub>2</sub> )	N° morti attesi per classe di età (e <sub>2</sub> )
0-9							
10-19							
20-29							
...							
Somma	D		E <sub>1</sub>		D	C <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>

Popolazione 1: tasso grezzo di mortalità:  $B_1/A_1$ ; tasso standardizzato di mortalità:  $E_1/D$ Popolazione 2: tasso grezzo di mortalità:  $B_2/A_2$ ; tasso standardizzato di mortalità:  $E_2/D$ 

Tabella 1B

Metodo di standardizzazione indiretto.

Classi di età	Numerosità popolazione 1 (a <sub>1</sub> )	N° morti (b <sub>1</sub> )		Numerosità popolazione 2 (a <sub>2</sub> )	N° morti (b <sub>2</sub> )	
0-9						
10-19						
20-29						
...						
Somma	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>		A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	
	↓			↓		
Classi di età	N° morti attesi per classe di età (e <sub>1</sub> )	N° morti (b <sub>1</sub> )	Tasso mortalità per classe di età popolazione di riferimento (r)	Numerosità popolazione 2 (d)	N° morti attesi per classe di età (e <sub>2</sub> )	Tasso mortalità per classe di età popolazione di riferimento (r)
0-9						
10-19						
20-29						
...						
Somma	A <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	R	A <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	R

Popolazione 1: tasso grezzo di mortalità:  $B_1/A_1$ ; rapporto standardizzato di mortalità (SMR<sub>1</sub>):  $B_1/E_1$   
tasso standardizzato di mortalità:  $SMR_1 \times R$ Popolazione 2: tasso grezzo di mortalità:  $B_2/A_2$ ; rapporto standardizzato di mortalità (SMR<sub>2</sub>):  $B_2/E_2$   
tasso standardizzato di mortalità:  $SMR_2 \times R$

**Tabella 2**

Effetto dell'età sul rischio di morte per COVID-19.

Dati della popolazione italiana riportati dall'aggiornamento dell'Istituto Superiore di Sanità pubblicato il 15 novembre 2020 (41) secondo l'età maggiore o uguale a 70 anni (dati ISTAT a fine 2019).

	Non esposti (età <70 anni)	Esposti (età ≥70 anni)
Vivi	49 789 723	10 413 186
Morti	6 038	35 692
Totale	49 795 761	10 448 878
Rischio incidente	$I_u=0,012\%$	$I_e=0,341\%$

per ciascuna classe di età (E) stima il numero di morti che si sarebbe osservato in quella popolazione se la mortalità fosse la stessa della popolazione di riferimento. Il parametro che si utilizza è il rapporto standardizzato di mortalità o SMR (*standardized mortality rate*), che è pari a:

$$\frac{\text{numero osservato di morti}}{\text{numero atteso di morti}} \times 100$$

Il tasso standardizzato di mortalità si stima come il prodotto del rapporto standardizzato di mortalità per il tasso di mortalità nella popolazione di riferimento (R).

Consideriamo il numero di morti osservati al 25 novembre (37): il numero per il Piemonte, pari a 4 108, è più alto di quello per la Campania, pari a 1 858; l'età media della popolazione in Piemonte è però più alta di quella della Campania, con il 29,1% di ultrasessantenni, rispetto al 21,5%. Il numero di morti per regione, però, non è stato presentato diviso per classi di età, mentre lo sono i dati nazionali. Considerando il numero di abitanti per classe di età, quale ricavato dai dati del Censimento del 2011, ed applicando una standardizzazione indiretta sulla base del numero di decessi per l'Italia per classe di età, il numero di morti osservati per il Piemonte risulta più alto del numero di decessi attesi, con un SMR di 112,6%, mentre per la Campania il numero osservato è di gran lunga inferiore al numero atteso, con un SMR di 38,5%. La differente distribuzione di età delle due regioni non costituisce quindi una spiegazione esauriente della differente mortalità.

Il Progetto Cuore riporta il tasso standardizzato di mortalità per malattie ischemiche del cuore per l'anno 2012 (39), rapportandolo alla Popolazione Europea Standard: 43,7 per 100 000 negli uomini e 20,4 nelle donne.

Per quanto riguarda COVID-19, è ampiamente noto come l'età rappresenti un fattore di rischio per mortalità. Esistono parametri che quantificano questo incremento, come quello di qualsiasi fattore di interesse: la frazione attribuibile alla popolazione (vedi) e la frazione attribuibile tra gli esposti (vedi). In presenza di un fattore

suscettibile di influenzare un parametro, in epidemiologia si parla di esposizione (*exposure*).

### Rischio attribuibile (AR) (*attributable risk, excess risk*)

È la differenza di rischio tra coloro che hanno un fattore di rischio e coloro che non lo hanno (esposti e non esposti) (1). Si consideri come esempio di fattore di rischio l'età superiore a 70 anni ed il rischio di morte per COVID 19. Secondo i dati ISTAT (dati a fine 2019) la popolazione italiana con età maggiore o uguale a 70 anni conta 10 448 878 persone; considerando i dati di mortalità per classe di età pari a 35 692, riportati dall'aggiornamento ISS pubblicato il 15 novembre (40) abbiamo un rischio incidente  $I_e$  di 0,341%; per i 49 795 761 abitanti di età inferiore a 70 anni i morti sono 6 038, per cui il rischio incidente  $I_u$  è 0,012 (Tabella 2).

Il rischio attribuibile è quindi:

$$I_e - I_u$$

quindi:

$$0,341 - 0,012 = 0,329\%$$

che rappresenta la quota di rischio di morte negli esposti che può essere attribuita all'età. Da questo parametro si calcola anche il numero attribuibile (*attributable number*) (1):

$$N_e \times (I_e - I_u)$$

dove  $N_e$  è il numero degli esposti, che risulta 34 259; larga parte dei decessi negli ultrasessantenni è legata all'età; sono infatti:

$$\frac{10\,413\,186 \times 0,329}{100} = 34\,259$$

rispetto ai 35 692 effettivamente computati.

Il rischio attribuibile si considera anche per fattori di rischio: nello studio di coorte della *Evans County*, iniziato nel 1961 (41) il rischio di morte a dieci anni attribuibile all'ipertensione sistolica era 0,23 nei maschi

bianchi e 0,15 nei maschi di colore.

**Frazione attribuibile alla popolazione  
(population attributable fraction, population  
attributable proportion, Levin's attributable risk)**

Il rischio attribuibile (vedi) di un fattore di rischio ha un impatto sugli eventi che dipende dalla prevalenza di quel fattore di rischio nella popolazione. Si calcola quindi la frazione attribuibile alla popolazione, che rappresenta la proporzione del tasso di mortalità che è attribuibile al fattore di rischio. Sia RR il rapporto tra il rischio di mortalità nei soggetti che hanno il fattore di rischio e quelli che non l'hanno.

Se una proporzione  $P_e$  della popolazione (stima non aggiustata) ha il fattore di rischio, la frazione attribuibile alla popolazione si calcola come:

$$\frac{P_e \times (RR-1)}{1+P_e \times (RR-1)}$$

Nell'esempio sviluppato per il rischio attribuibile (vedi) il rapporto tra il rischio di morte sopra i 70 anni, rispetto a quelli di età inferiore, è  $0,341/0,012=28,42$ . Rispetto alla popolazione totale di 60 244 639 abitanti, la numerosità degli ultrasessantenni, rappresenta una proporzione di esposti al fattore di rischio  $P_e$  pari a 0,173, cioè il 17,3% della popolazione.

La proporzione attribuibile alla popolazione corrisponde quindi a:

$$\frac{0,173 \times (28,42-1)}{1+0,173 \times (28,42-1)} = 0,825$$

Una interpretazione possibile di questo risultato è che circa l'83% della totalità dei decessi per COVID 19 sia attribuibile all'età.

Una stima della proporzione attribuibile alla popolazione è stata effettuata in un recente lavoro (42) che calcola quante morti sarebbero attribuibili all'influenza negativa delle dichiarazioni del Presidente USA del 3 aprile, contro l'uso delle maschere per prevenire COVID-19. Gli Autori considerano che l'uso della maschera riduce il rischio relativo di infezione da SARS CoV-2 a 0,56; ne consegue che il rischio di infezione non indossando la maschera è  $1/0,56=1,79$ . Un report del maggio 2020 riferisce che il 17,1% degli abitanti USA dichiarano di non indossare mai o raramente la maschera in pubblico: non sapendo quanti di questi siano effettivamente influenzati dalle dichiarazioni presidenziali, anche se molti sondaggi stimano elevata la sua influenza, viene ipotizzata una percentuale del 25%, che porta ad una quota di popolazione pari a  $0,017 \times 0,25 = 0,0425$ . La frazione attribuibile alla popolazione è quindi:

$$\frac{0,0425 \times (1,79-1)}{1+0,0425 \times (1,79-1)} = 0,032$$

Nel periodo considerato, dal 3 aprile al 21 luglio, il

CDC americano riporta 132 630 morti. Secondo questo calcolo  $0,032 \times 132 630 = 4 244$  morti sarebbero attribuibili all'influenza del discorso presidenziale, quota che sale a 8.356 se la percentuale influenzata è stimata al 50%.

Anche per i fattori di rischio tradizionali si calcola analogamente la frazione attribuibile alla popolazione. Nell'esempio precedentemente citato della *Evans County* la prevalenza di ipertensione sistolica era 0,26 nei maschi bianchi e più alta, pari a 0,47 nei maschi di colore; ne deriva che, nonostante il rischio attribuibile fosse più alto nei maschi bianchi, la frazione attribuibile alla popolazione risulta essere la stessa, pari a 0,26, nei due gruppi. L'interpretazione di questo parametro (41) è che circa un quarto della totalità delle morti sia attribuibile all'ipertensione.

Una generalizzazione della frazione attribuibile alla popolazione è rappresentata dalla frazione di impatto (*impact fraction*) che consente di tener conto sia di esposizioni protettive che di esposizioni che aumentano il rischio. Se P è la prevalenza dell'esposizione prima dell'introduzione di un fattore protettivo e P' la stessa dopo la sua introduzione, e RR il rischio relativo dell'evento valutato, la frazione di impatto si calcola come (43):

$$\frac{(P-P') \times (RR-1)}{P \times (RR-1) + 1}$$

Una metanalisi ha stimato che il rischio relativo di COVID-19 di chi indossa la maschera rispetto a chi non l'indossa è 0,34, con rischio di infezione del 3,1% per chi la indossa e del 17,4% nei rimanenti. La frazione di impatto dell'uso della maschera è quindi:

$$\frac{(0,174-0,031) \times (0,34-1)}{0,174 \times (0,34-1) + 1} = -0,107$$

Con l'uso della mascherina ci potremmo aspettare, sulla base di questi dati, una riduzione del 10,7% del rischio di contrarre la malattia.

**Frazione attribuibile all'esposizione (exposed  
attributable fraction)**

Rappresenta la proporzione di casi negli esposti che è attribuibile all'esposizione. Si calcola come:

$$\frac{RR-1}{RR} = \frac{I_e - I_u}{I_e}$$

dove  $I_e$  è l'incidenza in chi ha il fattore di rischio e  $I_u$  in chi non l'ha e RR il rischio relativo  $I_e/I_u$ . Riprendendo l'esempio dell'età  $\geq 70$  come fattore di rischio, la frazione attribuibile all'esposizione risulta:

$$\frac{28,17-1}{28,17} = 0,965$$

il che significa che il 96,5% dei decessi negli ultrasessantenni è attribuibile al rischio dell'età. L'utilità nella comunicazione di questa misura è sottolineata da

una recente rassegna di *Lancet Infectious Diseases* (44).

### Case-fatality rate (o case-fatality ratio)

È una informazione importante per la pianificazione sanitaria, ma anche per la divulgazione sull'impatto di una malattia.

È definito come:

$$\frac{n. di morti tra i casi incidenti attribuiti ad una malattia in un intervallo di tempo}{n. di casi incidenti della stessa malattia nello stesso intervallo di tempo} \times 10^n$$

Il *case-fatality rate* è una proporzione, in quanto la stima del numeratore è limitata ai casi inclusi nel denominatore.

Il sito della JHU (7) riporta il *case-fatality ratio* nelle varie aree. Consultando i dati di *Our world in data* (45), in Italia era 7,2% a marzo, si è ridotto a 3,5% a novembre. Come valori di riferimento si possono considerare il 10% della SARS, il 34% della MERS-CoV e il 50% di Ebola (46).

Il *case-fatality rate* è stato utilizzato anche da uno studio multicentrico italiano teso a valutare l'impatto della pandemia in corso, rispetto al numero e al ritardo dei ricoveri per infarto del miocardio (47). Su 319 pazienti ricoverati per infarto miocardico in una settimana campione nei 54 ospedali partecipanti, si avevano 31 decessi, portando ad una stima del *case-fatality rate* di:

$$\frac{31}{319} \times 10^2 = 9,72\%$$

significativamente superiore al 2,8% di un periodo equivalente dell'anno precedente.

### Tasso di letalità (death-to-case ratio)

Rappresenta una informazione simile al *case-fatality rate*, ma non coincidente (48), anche se non tutte le fonti mantengono questa distinzione. È definito come:

$$\frac{\text{numero di morti attribuiti ad una malattia nell'intervallo di tempo considerato}}{\text{numero di nuovi casi della stessa malattia nello stesso intervallo di tempo}} \times 10^2$$

Il tasso di letalità è un rapporto, ma non è necessariamente una proporzione, in quanto alcune delle morti contate al numeratore possono realizzarsi in persone che si sono ammalate prima del periodo considerato, e quindi non sono conteggiate nel denominatore.

Il tasso di letalità si differenzia dal tasso di mortalità in quanto per questo il denominatore è costituito dalla totalità degli esposti a rischio, mentre per il tasso di letalità è costituito dai casi affetti dalla malattia di interesse.

La definizione di tasso di letalità diviene meno nitida nel contesto delle patologie croniche: il Progetto Cuore definisce come letalità (10) la percentuale di persone affette da una malattia che muore entro un determinato

intervallo di tempo. Questa definizione si applica a eventi coronarici acuti (infarto o sindrome coronarica), per i quali è in genere identificabile la data di insorgenza.

### Infection-fatality ratio

L'informazione che realmente descriverebbe l'impatto prognostico di COVID-19 è la *infection fatality ratio*:

$$\frac{\text{numero di morti tra gli individui infetti}}{\text{individui infetti (sintomatici e asintomatici)}} \times 10^n$$

Differisce da *case-fatality ratio* (vedi) perché di fatto sussiste l'impossibilità di conteggiare in modo esauriente i casi asintomatici.

Una stima del numero totale di casi (inclusendo gli asintomatici) è stata effettuata sulla base di numerose assunzioni matematiche (49), e stimata pari a 9,4 per mille individui infetti.

Si ritiene che una stima più affidabile degli infetti possa derivare dalle indagini sierologiche sulla popolazione.

### Eccesso di mortalità (excess mortality)

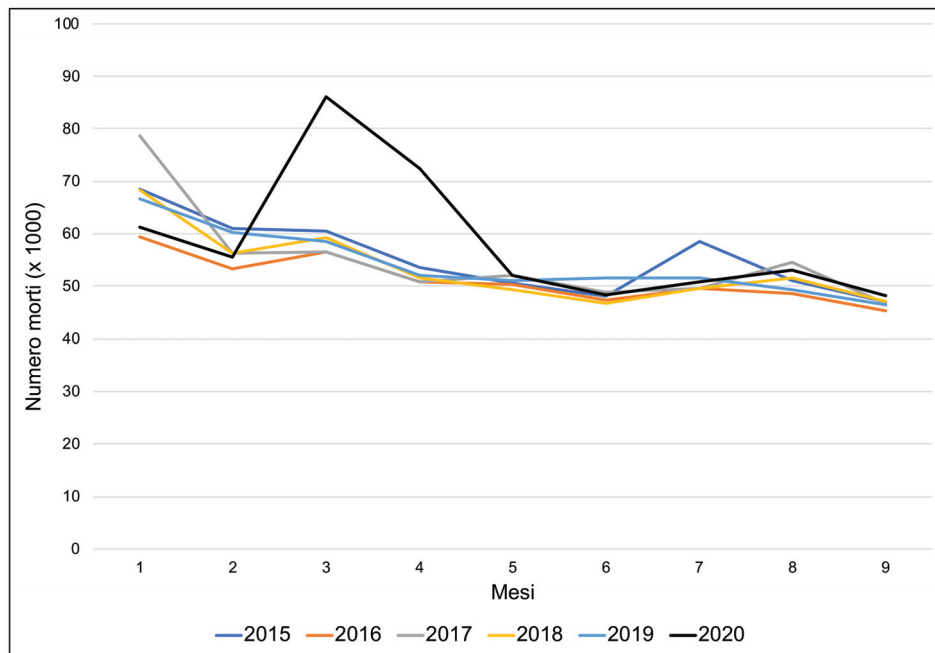
È l'aumento del numero di decessi durante un certo periodo di tempo, rispetto alla mortalità normalmente prevista nella stessa stagione. Infatti, i decessi vengono contati tutti, indipendentemente dalla causa: durante un evento come un'epidemia, la malattia può avere effetti sulla mortalità in vario modo, per peggioramento di patologie concomitanti, per ridotto accesso alle strutture ospedaliere per timore dell'epidemia, per aggravamento di malattie non diagnosticate, suicidi, per conversione di reparti ospedalieri a reparti COVID, con riduzione dell'assistenza, per sospensione degli screening diagnostici, per ritardo degli interventi chirurgici elettivi, e così via.

Tale dato emerge con chiarezza nel report ISTAT (50) che confronta la mortalità nel periodo gennaio settembre dell'anno 2020 con quella degli anni 2015-2019 (figura 3): risulta evidente come il dato sia sostanzialmente stabile nei quattro anni precedenti, mentre presenta una chiara impennata nel 2020.

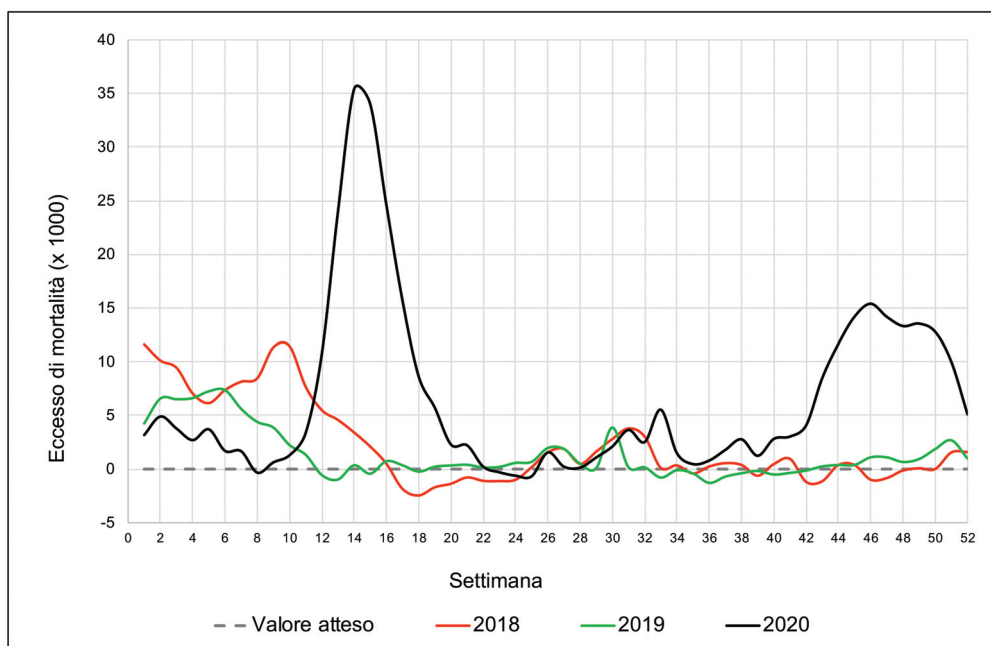
Anche l'*European Mortality Monitoring activity* (EuroMOMO) presenta i dati di 26 paesi europei come eccesso di mortalità (51) (Figura 4): oltre all'usuale aumento di mortalità per tutte le cause nei mesi invernali, la curva del 2020 presenta un picco in primavera e un picco in autunno.

### Tempo al raddoppio del numero di morti (death doubling time)

È il tempo che intercorre tra il numero di morti in una data giornata e la giornata precedente in cui il numero di morti fosse la metà, calcolato per ciascuna nazione. I valori sono riportati nel sito *Our world in data* (52). Oltre



**Figura 3**  
Andamento della mortalità totale negli anni dal 2015 al 2020 [dati ISTAT (51)]: risulta evidente l'eccesso di mortalità nei primi mesi del 2020



**Figura 4**  
Andamento dell'eccesso di mortalità nei dati dell'European Mortality Monitoring activity (EuroMOMO) su 26 paesi europei (52) negli anni dal 2018 al 2020, rispetto al valore atteso (linea tratteggiata)

al problema di numeri distorti per nazioni con numero di abitanti e morti molto basso, come Gibilterra e Liechtenstein, l'interpretazione può essere interessante in caso di andamento monotono crescente, ma più controversa in caso di andamento bimodale. L'Italia, ad esempio, presenta un tempo di 215 giorni, piuttosto lungo, ma l'andamento decorre tra i 25 969 morti del 25 aprile e i 52 028 del 26 novembre 2020, con un apparente allungamento legato al rallentamento della pandemia all'inizio dell'estate.

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

- Oxford Reference. A dictionary of epidemiology (6 ed.) <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199976720.001.0001/acref-9780199976720>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- Hernandez JBR, Kim PY. Epidemiology Morbidity and Mortality. [Updated 2020 Oct 13]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547668/>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40431>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- Rapporto ISS COVID-19 • n. 49/2020. COVID-19: rapporto ad interim su definizione, certificazione e classificazione delle cause di morte. [https://www.iss.it/documents/20126/0/Rapporto+ISS+COVID-19++49\\_2020+%281%29.pdf/9378da12-76ae-f51f-9666-14c7c2078a17?t=1592583825077#:~:text=test%20pan%2Doronavirus, Caso%20confermato, segni%20e%20dai%20sintomi%20clinici](https://www.iss.it/documents/20126/0/Rapporto+ISS+COVID-19++49_2020+%281%29.pdf/9378da12-76ae-f51f-9666-14c7c2078a17?t=1592583825077#:~:text=test%20pan%2Doronavirus, Caso%20confermato, segni%20e%20dai%20sintomi%20clinici). Ultimo accesso: gennaio 2021
- <http://opendatadpc.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/b0c68bce2cce478eaac82fe38d4138b1>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/sars-cov-2-dashboard>. Ultimo accesso: dicembre 2020
- Johns Hopkins Coronavirus Resource Center – <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- <http://www.cuore.iss.it/indicatori/incidenza>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- <http://www.cuore.iss.it/indicatori/attacco-eventi-coronarici-eta>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- <http://www.cuore.iss.it/leggere/glossario>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- <http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/freq/attac.htm>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- Liu Y, Eggo RM, Kucharski AJ. Secondary attack rate and superspreading events for SARS-CoV-2. *Lancet* 2020;395:e47.
- Madewell ZJ, Yang Y, Longini IM Jr, et al. Household transmission of SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2020;3:e2031756.
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/weekly-subnational-14-day-notification-rate-covid-19>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- Harshfield EL, Pennells L, Schwartz JE, et al. Emerging Risk Factors Collaboration. Association between depressive symptoms and incident cardiovascular diseases. *JAMA* 2020;324:2396-405.
- Piccolo R, Bruzzese D, Mauro C, et al. Population trends in rates of percutaneous coronary revascularization for acute coronary syndromes associated with the COVID-19 Outbreak. *Circulation* 2020;141:2035-7.
- [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_navigazioneSecondariaRelazione\\_1\\_listaCapitoli\\_capitolitemName\\_1\\_scarica.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_navigazioneSecondariaRelazione_1_listaCapitoli_capitolitemName_1_scarica.pdf). Ultimo accesso: gennaio 2021
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/download-data-hospital-and-icu-admission-rates-and-current-occupancy-covid-19>. Ultimo accesso: gennaio 2021
- [https://www.iss.it/primo-piano//asset\\_publisher/o4oGR9qmvUz9/content/faq-sul-calcolo-del-rt](https://www.iss.it/primo-piano//asset_publisher/o4oGR9qmvUz9/content/faq-sul-calcolo-del-rt). Ultimo accesso: gennaio 2021
- Prevenzione e risposta a COVID-19: evoluzione della strategia e pianificazione nella fase di transizione per il periodo autunno-invernale. Circolare del Ministero della Salute num. 0032732 del 12 ottobre 2020. [https://www.iss.it/monografie//asset\\_publisher/xMmWlh34K1VK/content/id/5492235](https://www.iss.it/monografie//asset_publisher/xMmWlh34K1VK/content/id/5492235). Ultimo accesso: gennaio 2021
- Fraser C. Estimating individual and household reproduction numbers in an emerging epidemic. *PLoS One* 2007;2:e758.
- Knight J, Mishra S. Estimating effective reproduction number using generation time versus serial interval, with application to covid-19 in the Greater Toronto Area, Canada. *Infect Dis Model* 2020;5:889-96.
- [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_notizie\\_5182\\_0\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_notizie_5182_0_file.pdf). Ultimo accesso: novembre 2020
- Cori A, Ferguson NM, Fraser C, et al. A new framework and software to estimate time-varying reproduction numbers during epidemics. *Am J Epidemiol.* 2013;178:1505-12.
- [https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/open-data/rt\\_diapo.pdf](https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/open-data/rt_diapo.pdf) Ultimo accesso: gennaio 2021
- Chowell G, Castillo-Chavez C, Fenimore PW, et al. Model parameters and outbreak control for SARS. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1258-63.
- Guerra FM, Bolotin S, Lim G, et al. The basic reproduction number (R0) of measles: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e420–e428.
- Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med* 2020;382:1199-207.
- D'Arienzo M, Coniglio A. Assessment of the SARS-CoV-2 basic reproduction number, R0, based on the early phase of COVID-19 outbreak in Italy. *Biosaf Health* 2020;2:57-9.
- Alimohamadi Y, Taghdir M, Sepandi M. The estimate of the basic reproduction number for novel coronavirus disease (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *J Prevent Med Public Health* 2020 doi: 10.3961/jpmph.20.076.
- Petersen E, Koopmans M, Go U, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis* 2020;20:e238-e244.
- <https://ourworldindata.org/grapher/covid-cases-per-capita-vs-doubling-time?tab=table&time=2020-11-25>. Ultimo accesso: novembre 2020
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/data-national-14-day-notification-rate-covid-19>. Ultimo accesso: dicembre 2020
- Giorgi Rossi P, Marino M, Formisano D, et al. Characteristics and outcomes of a cohort of COVID-19 patients in the Province of Reggio Emilia, Italy. *PLoS ONE* 2020;15:e0238281.
- <https://analysis.covid19healthsystem.org/index.php/2020/06/04/how-comparable-is-covid-19-mortality-across-countries/> Ultimo accesso: gennaio 2021
- <https://opendatadpc.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/>

- index.html#/b0c68bce2cce478eaac82fe38d4138b1. Ultimo accesso: gennaio 2021
37. <https://ourworldindata.org/covid-deaths>. Ultimo accesso: novembre 2020
  38. <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/sars-cov-2-decessi-italia#2>. Ultimo accesso: dicembre 2020
  39. ISTAT. Impatto dell'epidemia COVID-19 sulla mortalità totale della popolazione residente primo quadrimestre 2020. [https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/pdf/Rapp\\_Istat\\_Iss\\_9luglio.pdf](https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/pdf/Rapp_Istat_Iss_9luglio.pdf)
  40. <http://www.cuore.iss.it/indicatori/mortalita-ischemiche>. Ultimo accesso: gennaio 2021
  41. Task force COVID-19 del Dipartimento Malattie Infettive e Servizio di Informatica, Istituto Superiore di Sanità. Epidemia COVID-19, Aggiornamento nazionale: 13 novembre 2020. [https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19\\_11-novembre-2020.pdf](https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19_11-novembre-2020.pdf). Ultimo accesso: gennaio 2021
  42. Deubner DC, Tyroler HA, Cassel JC, et al. Attributable risk, population attributable risk, and population attributable fraction of death associated with hypertension in a biracial population. *Circulation* 1975;52:901-8.
  43. Hahn RA. Estimating the COVID-related deaths attributable to President Trump's early pronouncements about masks. *Int J Health Serv* 2020 doi:10.1177/0020731420960345.
  44. Barendregt JJ, Veerman JL. Categorical versus continuous risk factors and the calculation of potential impact fractions. *J Epidemiol Community Health* 2010;64:209-12.
  45. von Cube M, Timsit JF, Schumacher M, et al. Quantification and interpretation of attributable mortality in core clinical infectious disease journals. *Lancet Infect Dis* 2020;20:e299-e306
  46. <https://ourworldindata.org/mortality-risk-covid#the-current-case-fatality-rate-of-covid-19>. Ultimo accesso: gennaio 2021
  47. <https://ourworldindata.org/mortality-risk-covid#case-fatality-rate-of-covid-19-compared-to-other-diseases>. Ultimo accesso: gennaio 2021
  48. De Rosa S, Spaccarotella C, Basso C, et al; Società Italiana di Cardiologia and the CCU Academy investigators group. Reduction of hospitalizations for myocardial infarction in Italy in the COVID-19 era. *Eur Heart J* 2020;41:2083-8.
  49. <https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson3/section3.html>. Ultimo accesso: gennaio 2021
  50. [https://instituteofdiseasemodeling.github.io/nCoV-public/analyses/first\\_adjusted\\_mortality\\_estimates\\_and\\_risk\\_assessment/2019-nCoV-preliminary\\_age\\_and\\_time\\_adjusted\\_mortality\\_rates\\_and\\_pandemic\\_risk\\_assessment.html](https://instituteofdiseasemodeling.github.io/nCoV-public/analyses/first_adjusted_mortality_estimates_and_risk_assessment/2019-nCoV-preliminary_age_and_time_adjusted_mortality_rates_and_pandemic_risk_assessment.html). Ultimo accesso: gennaio 2021
  51. <https://www.istat.it/it/archivio/240401>. Ultimo accesso: gennaio 2021
  52. <https://www.euromomo.eu/bulletins/2020-48/>. Ultimo accesso: gennaio 2021
  53. <https://ourworldindata.org/covid-deaths>. Ultimo accesso: gennaio 2021

## APPENDICE

*Termini considerati, ordinati alfabeticamente secondo la lingua Italiana e Inglese*

Italiano	Inglese	Inglese	Italiano
Eccesso di mortalità	Mortality excess	Adjusted mortality rate	Tasso standardizzato di mortalità
Esposizione	Exposure	Attack rate	Tasso di attacco
Frazione attribuibile alla popolazione	Population attributable fraction	Attributable risk, excess risk	Rischio attribuibile
	Population attributable proportion	Basic reproduction number	Numero di riproduzione di base
Frazione attribuibile all'esposizione	Exposed attributable fraction	Case notification rate	Tasso di notifica dei casi
Frazione di impatto	Impact fraction	Cause-specific mortality	Tasso di mortalità causa-specifica
Incidenza	Incidence	Crude death rate	Tasso (grezzo) di mortalità
Morbilità	Morbidity	Deaths doubling time	Tempo al raddoppio del numero di morti
Mortalità	Mortality	Death-to-case ratio	Tasso di letalità
Numero di riproduzione di base	Basic reproduction number	Doubling time of cases	Tempo al raddoppio dei casi
Numero di riproduzione effettivo	Effective reproduction number	Effective reproduction number	Numero di riproduzione effettivo
Percentuale di tamponi positivi	Percentage of positive specimen	Exposed attributable fraction	Frazione attribuibile all'esposizione
Popolazione a rischio	Population at risk	Exposure	Esposizione
Prevalenza	Prevalence	Hospitalization rate	Tasso di ospedalizzazione
Rapporto di tasso di incidenza	Incidence rate ratio	Impact fraction	Frazione di impatto
Rischio attribuibile	Attributable risk, excess risk	Incidence	Incidenza
Rischio incidente	Incidence risk	Incidence rate	Tasso di incidenza
Standardizzazione	Standardization	Incidence rate ratio	Rapporto di tasso di incidenza
Tasso di attacco	Attack rate	Incidence risk	Rischio incidente
Tasso di attacco secondario	Secondary attack rate	Morbidity	Morbilità
Tasso di incidenza	Incidence rate	Mortality	Mortalità
Tasso di letalità	Death-to-case ratio	Mortality excess	Eccesso di mortalità
Tasso di mortalità causa-specifica	Cause-specific mortality	Percentage of positive specimen	Percentuale di tamponi positivi
Tasso di notifica dei casi	Case notification rate	Population at risk	Popolazione a rischio
Tasso di ospedalizzazione	Hospitalization rate	Population attributable fraction	Frazione attribuibile alla popolazione
Tasso di prevalenza	Prevalence rate	Population attributable proportion	
Tasso (grezzo) di mortalità	Crude death rate	Prevalence	Prevalenza
Tasso standardizzato di mortalità	Adjusted mortality rate	Prevalence rate	Tasso di prevalenza
Tempo al raddoppio dei casi	Doubling time of cases	Secondary attack rate	Tasso di attacco secondario
Tempo al raddoppio del numero di morti	Deaths doubling time	Standardization	Standardizzazione

## Integrità della ricerca: comprendere la nostra comune responsabilità per un sistema accademico sostenibile

Martin Szomszor<sup>1</sup>, Nandita Quaderi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Director at the Institute for Scientific Information

<sup>2</sup>Editor-in-Chief of Web of Science

Traduzione a cura di Francesca Biancalani, Scuola di Specialità in Patologia Clinica e Biochimica Clinica, Università di Firenze

### ABSTRACT

#### Research Integrity: Understanding our shared responsibility for a sustainable scholarly ecosystem.

This report encourages everyone involved in research to broaden their view of what it means to conduct research with integrity and to consider how certain research evaluation instruments and incentive mechanisms are leading to a rise in deviant publication behavior. Research integrity is a crucial topic for all those involved in the creation, delivery and assessment of academic literature. Without a trusted record of research, it is impossible to reliably build on previous ideas, replicate results, or effectively utilize the outcomes of research. The traditional focus on fabrication, falsification and plagiarism is no longer enough – new forms of manipulation are emerging as some stakeholders seek an unfair advantage. Our report is intended as a guide – first, to expose the range of tactics used; second, to describe our varied and collaborative responsibilities; and third, to highlight current and future technological enhancements that will help us all uphold the principles of research integrity. Many of the tactics we describe are subtle, often manifesting as small infringements, but when accumulated over large quantities, their effects can be substantial and rewarding. The future will be challenging as the digital transformation of research continues to accelerate our progress. Collaboration is essential since no single party can be expected to police and enforce research integrity – it is a shared responsibility that will require us to come together to develop new guidelines on what is considered unethical and decide on the appropriate actions to take when community norms are breached.

### INTRODUZIONE

#### L'editoria accademica ha un ruolo essenziale e durevole nella divulgazione della ricerca scientifica, in quanto fornisce il substrato necessario sul quale le idee possono essere scambiate, criticate e migliorate.

Attualmente, lo sviluppo delle tecnologie digitali ha reso questo processo più rapido e ne ha aumentato la portata quanto mai prima, imprimendo un ulteriore slancio all'impegno scientifico globale. Questa impresa

comune fornisce diffusi benefici socio-economici e svolge un ruolo di fondamentale importanza nel realizzare un futuro equo e sostenibile.

Il valore della ricerca è in larga parte attribuito ad un'idea condivisa di integrità, e precisamente al concetto che l'adozione di una condotta etica ed onesta unita all'utilizzo di metodologie consolidate e ad una rigorosa revisione tra pari produca risultati affidabili, riproducibili e verificabili. Qualsiasi tipo di ricerca, sia essa condotta in laboratorio, sul campo, *in silico*<sup>1</sup> o come mero prodotto intellettuale, viene generalmente presentata sotto forma di pubblicazione scientifica, utilizzata per comunicare i

<sup>1</sup>NdT. Per ricerca *in silico* si intende una ricerca scientifica effettuata tramite simulazione al computer

Questo articolo è la traduzione italiana di *Research Integrity: Understanding our shared responsibility for a sustainable scholarly ecosystem* by Martin Szomszor and Nandita Quaderi. Institute of Scientific Information, con l'autorizzazione dell'Editore. L'articolo originale è disponibile come materiale supplementare (1S). L'Institute for Scientific Information (WEB of Science - Clarivate) ha approvato la traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale. (<https://clarivate.com/webofsciencegroup/campaigns/research-integrity-understanding-our-shared-responsibility-for-a-sustainable-scholarly-ecosystem/>)

Ricevuto: 19.01.2021

Revisionato: 19.01.2021

Accettato: 20.01.2021

Pubblicato on-line: 09.02.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.003

risultati e contribuire a creare un patrimonio culturale condiviso. In quanto tale, una pubblicazione riflette il livello di integrità che è stato adottato, non solo per quanto riguarda il progetto di ricerca, ma anche durante la sua elaborazione, la stesura dell'articolo, il processo di revisione tra pari e la linea editoriale.

Dopo la pubblicazione, la qualità della ricerca viene valutata con varie procedure di verifica da parte dei numerosi "stakeholders" coinvolti. Questo processo è fondamentale per alimentare meccanismi di incentivazione e per fornire lo stimolo necessario a promuovere il miglioramento continuo. Tuttavia, se non applicato in modo virtuoso, tale processo può diventare un incentivo a ledere l'integrità della ricerca, inducendo qualcuno dei protagonisti ad adottare scorciatoie per ottenere vantaggi non eticamente corretti.

Questo articolo ha l'obiettivo di valutare il panorama accademico nel contesto dell'integrità della ricerca, indicando i vari momenti nei quali è possibile minare il sistema, rilevando il crescente numero di meccanismi usati per aggirare il sistema ed individuando le motivazioni dei vari "stakeholder".

L'identificazione delle diverse responsabilità consente di evidenziare che è necessario uno sforzo collettivo per combattere coloro che si propongono di sovvertire l'integrità della ricerca. Vengono qui fornite pertanto raccomandazioni su come la tecnologia, i dati e le tecniche di analisi possano essere usati per individuare e attenuare eventuali comportamenti disonesti e fraudolenti.

## CHE COS'È L'INTEGRITÀ DELLA RICERCA E PERCHÉ È IMPORTANTE?

***"Se ho visto più lontano è perché stavo sulle spalle dei giganti" - Newton, 1676***

Attraverso l'epoca dell'illuminismo e la formulazione del metodo scientifico, il XVII secolo ha promosso l'adozione di norme etiche all'interno della comunità scientifica, ponendo le basi formali per il processo di revisione e per l'inizio della documentazione scientifica, un patrimonio condiviso di scoperte che può essere esaminato in modo critico ed utilizzato come base per la formulazione di nuove idee ed il riconoscimento del contributo dei ricercatori (Ayala 1994). Questo è un punto di fondamentale importanza di questo articolo poiché la veridicità dei dati delle pubblicazioni è cruciale per garantire la sostenibilità della ricerca scientifica. Attraverso la incessante pubblicazione di nuovi articoli scientifici negli anni, molte e molte nozioni si sono aggiunte al patrimonio condiviso della conoscenza umana, consentendo di produrre nuove idee sulla base di quelle precedentemente pubblicate, mettere in discussione le conoscenze pregresse e collocare il contributo della ricerca scientifica in un contesto più ampio. Qualsiasi ricercatore che inquina questo scenario rischia di compromettere la ricerca futura, insidia la ricerca in corso, e genera frustrazione in coloro che cercano di impiegare i dati nella pratica.

Solo negli anni '70 la cattiva condotta scientifica è diventata una questione di interesse pubblico. Negli anni sono stati resi noti vari casi di frode scientifica, in particolare nel 1974 quello dell'immunologo William Summerlin che ha colorato artificialmente un trapianto di pelle tra topi. Questi eventi portarono nel 1981 ad un procedimento di accertamento giudiziario da parte del "Investigations and Oversight Subcommittee of the House Science and Technology Committee" statunitense. A partire dagli anni '80 sono state istituite varie agenzie con il compito di gestire le problematiche relative all'integrità nella ricerca, tra cui l'Office of Research Integrity negli Stati Uniti e il Research Integrity Office nel Regno Unito. La maggior parte delle agenzie che finanziano la ricerca scientifica hanno stabilito un proprio codice di condotta, mentre i collegi professionali e le società scientifiche forniscono linee guida ai propri membri e varie organizzazioni intergovernative contribuiscono pubblicando ulteriori raccomandazioni (vedi Appendice).

Gli editori scientifici svolgono un ruolo fondamentale nel valutare l'integrità delle pubblicazioni in quanto gestiscono la revisione dei manoscritti a loro inviati, al fine di stabilire se posseggano i requisiti necessari per essere pubblicati. Negli ultimi anni, tale attività è divenuta l'epicentro di un conflitto etico, dal momento che vari ricercatori hanno colto l'opportunità di sfruttare il processo a proprio vantaggio. Di conseguenza, i direttori, gli editori associati ed i revisori sono stati sottoposti ad un rigoroso controllo al fine di garantire il mantenimento di standard adeguati. Talvolta, tuttavia, accade che siano i membri stessi dei gruppi sopracitati a tentare di invalidare tale sistema di valutazione. In questi casi, i confini della disputa diventano poco chiari poiché spesso i ricercatori sono anche revisori e membri dei comitati editoriali. A tal fine, organizzazioni come il Committee for Publication Ethics (COPE) forniscono consulenze dettagliate e pratiche agli editori su come identificare e gestire eventuali casi di cattiva condotta nell'ambito dell'editoria scientifica, considerando che la necessità di consulenza è aumentata.

L'integrità della ricerca non consiste necessariamente in una presentazione corretta dei dati fin dall'inizio. I ricercatori, sia quando lavorano in veste di autori che di revisori, possono commettere errori; lo scopo del sistema di revisione e ritrattazione è quello di garantire la qualità delle pubblicazioni. Pulverer (2015) scrive: *"In effetti, la ritrattazione di articoli, che spesso riguarda articoli pubblicati da molto tempo, deve essere vista come un segnale che la tanto pubblicizzata natura auto-correttiva della letteratura scientifica funziona correttamente in questi tempi"*

Ciononostante, l'esistenza di una documentazione scientifica priva di errori non è facilmente realizzabile, né realistica. Ad esempio, la mancata pubblicazione di risultati negativi comporta lacune nella nostra conoscenza e rimane una problematica da superare (Matosin 2014). Il tema dell'integrità nella ricerca è di crescente e evidente interesse nell'ambito dell'editoria accademica. Come mostrato in Figura 1, il numero

annuale di articoli che trattano questo tema, indicizzati in Web of Science™ tra il 1982 e il 2019, sono notevolmente aumentati.

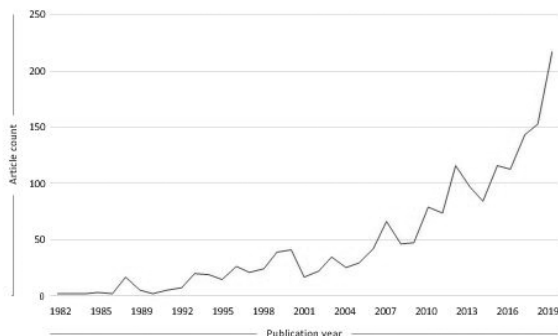


Figura 1

Numero di articoli riguardanti l'integrità della ricerca indicizzati in Web of Science

## PERCHÉ L'INTEGRITÀ DELLA RICERCA VIENE COMPROMESSA?

***"È quasi certo che la cattiva condotta sia sempre stata una caratteristica della ricerca scientifica" - Lock, 1994***

È importante sottolineare che la cattiva condotta non è "binaria", ma che esiste uno spettro di comportamenti che possono essere interpretati come inappropriati. Questi infatti variano da frodi minori (come quando un ricercatore aggiunge un riferimento bibliografico superfluo di un suo lavoro precedente), fino a catastrofiche pratiche fraudolente (come la fabbricazione dei risultati di studi clinici). In un numero minore di casi, è possibile che alcuni ricercatori reputino che i loro comportamenti non siano eticamente discutibili, o per ignoranza, o perché considerano talune pratiche comuni all'interno della loro comunità scientifica (se lo fanno tutti, perché io non dovrei?).

Spesso, il costruito sociale e professionale stesso indica implicitamente ciò che è considerato accettabile, tipicamente quando il vantaggio ottenuto è esiguo o impercettibile e gli standard etici non sono definiti in maniera rigorosa. Solo quando la gravità della cattiva condotta aumenta, la linea di confine risulta più netta, ed è quindi possibile identificare con sicurezza i trasgressori.

Indipendentemente dall'intento personale o di gruppo (ottenere fama, fortuna o potere), occorre considerare il contesto generale. Nell'ambito della ricerca scientifica, la pressione a cui si è sottoposti per ottenere maggiori prestazioni è il fattore chiave che rende la valutazione una componente cruciale dell'ingranaggio che influenza il comportamento individuale. Vari sono gli indicatori identificati, come i

finanziamenti ottenuti, gli articoli pubblicati e il numero di citazioni ricevute. Di fatto questi numeri vengono poi utilizzati da coloro che sono deputati a prendere le decisioni. Gli studenti consultano le classifiche per decidere dove studiare. I ricercatori sono valutati dai loro datori di lavoro, dai finanziatori e dalle agenzie nazionali per stabilirne l'idoneità e la competenza a svolgere ruoli di ricerca. Le riviste sono valutate dai ricercatori, per stabilire la sede di pubblicazione, e dai propri organi di "governance" in termini di sostenibilità finanziaria. Ovviamente poi, ogni individuo si misura con i propri pari per progettare una strategia di successo.

Molti dei problemi intrinseci relativi ad un tale sistema di valutazione sono attualmente sotto esame ed hanno prodotto diversi sforzi per consolidare il consenso e migliorare la valutazione della ricerca scientifica, in particolare il documento "San Francisco Declaration on Research Assessment" (DORA) ed il "Leiden Manifesto" (Hicks et al. 2015). La volontà di riformare il sistema è stata esemplificata dalla recente variazione delle politiche adottate in Cina, che ha portato ad eliminare l'uso di una valutazione basata sulle metriche riferite al singolo articolo in favore di un sistema di valutazione più completo (Zhang & Siversten 2020). Ovviamente, occorre considerare anche questioni sociali più ampie che possono influenzare la modalità con la quale la ricerca e i ricercatori sono valutati (come il bando di atti di bullismo e di discriminazione, o l'impegno per favorire la diversità), che sono al di fuori degli scopi in questo articolo.

Di seguito, sono elencati i principali "stakeholder" coinvolti nella difesa dell'integrità della ricerca e vengono genericamente descritte le motivazioni principali. È utile che questi fattori vengano tenuti presenti in quanto nel proseguo dell'articolo vengono esaminate le diverse modalità con le quali la cattiva condotta si relaziona con essi.

- **I ricercatori** ambiscono ad aumentare la propria posizione pubblicando un numero elevato di articoli su riviste di alta qualità, che ricevono un elevato numero di citazioni. Questo aumenta la loro possibilità di ricevere finanziamenti, di acquisire una miglior posizione in ambito istituzionale, editoriale o di consulenza, e generalmente, di assicurarsi una lunga carriera.
- **Le riviste scientifiche** desiderano attrarre e pubblicare i lavori scientifici migliori nel loro campo, o aumentare il numero delle pubblicazioni per garantire produttività, sostenibilità a lungo termine e crescita dei lettori.
- **Gli editori** sono interessati a realizzare un portfolio di riviste prestigiose, possibilmente specializzate per settore, modalità di pubblicazione, soglia di accettazione e altro.
- **Le istituzioni** ambiscono ad attirare, formare, promuovere e trattenere personale accademico che produca ricerche di spicco a livello mondiale, con ampi benefici socio-economici. A sua volta, disporre di

ricercatori di valore permette loro di ottenere posizioni più vantaggiose nelle graduatorie, favorendo le candidature degli studenti, aumentando l'appoggio degli ex-laureati e consentendo il reclutamento di docenti di altissimo livello.

- **I finanziatori** mirano ad investire i fondi in gruppi di ricerca e progetti in grado di fornire risultati di impatto elevato.
- **I governi** sono interessati ad avviare ed investire in progetti di ricerca produttivi e con una gestione caratterizzata da standard elevati, che possa garantire vantaggi politici, economici e culturali.
- **I fornitori di database e di sistemi di analisi dei dati** si adoperano per fornire funzionalità utili di ricerca ed esplorazione che permettano ai ricercatori di lavorare in modo rapido e più efficiente, oltre a fornire strumenti di analisi (inclusi le misurazioni statistiche e gli indicatori) che supportino la valutazione della ricerca.

### QUALI SONO I DIVERSI TIPI DI COMPORTAMENTO CHE MINANO L'INTEGRITÀ DELLA RICERCA?

**Il processo di proposizione, conduzione e pubblicazione delle ricerche scientifiche è complesso, spesso coinvolge molte persone che svolgono mansioni differenti e si basa sull'aspettativa che ognuno di essi aderisca alle norme etiche della comunità d'appartenenza.**

Delle quattro norme descritte diverso tempo fa da Robert K. Merton fondatore della sociologia della scienza (Merton 1942), è il disinteresse la norma necessaria al controllo della autogratificazione. Sottolineando che si riscontra *“una virtuale assenza di frodi negli annali della scienza”*, Merton, mette in relazione il disinteresse, con la *“massima responsabilità degli scienziati verso i propri pari”*. Chiaramente, come la storia della scienza ha registrato nell'ultimo mezzo secolo, si è osservato un aumento dei casi di cattiva condotta nella ricerca contestualmente al progresso scientifico ed accademico nel secondo dopoguerra, e forse ancora di più negli ultimi decenni (Fanelli et al. 2015, Fang et al. 2012). Tuttavia, è notoriamente difficile stimare l'entità o l'andamento nel tempo dei comportamenti scorretti (Fanelli 2009, Lordo 2016, Zuckerman 2020). In primo luogo, c'è il problema della definizione di cosa costituisce una cattiva condotta nell'ambito della ricerca scientifica. Molte istituzioni utilizzano l'acronimo FFP (fabbricazione, falsificazione, plagio) per descrivere il fenomeno. In secondo luogo, esiste la questione della segnalazione e del rilevamento.

Infine, esistono cambiamenti all'interno del sistema di ricerca che rendono un periodo non confrontabile con un altro.

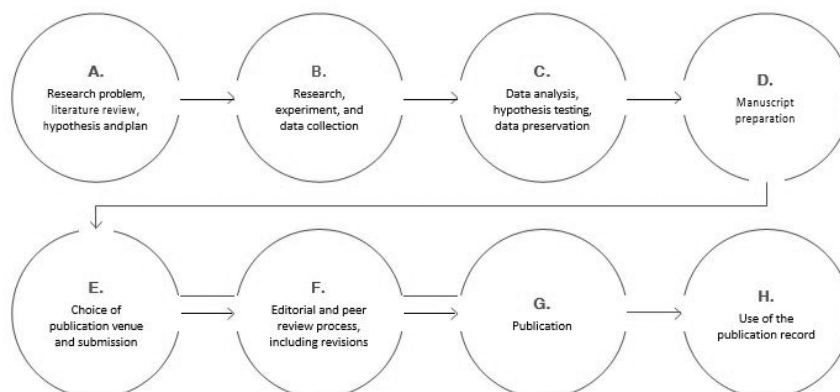
Nell'attuale regime di responsabilità e valutazione dei risultati della ricerca, la rigida competizione per ottenere finanziamenti e la rivoluzione digitale nelle pubblicazioni hanno prodotto nuovi comportamenti che possono essere considerati più come epifenomeni nel contesto dell'attività di ricerca e di pubblicazione, che non fenomeni del tipo tradizionalmente monitorato come FFP (Edwards & Roy 2017). Tra questi comportamenti si annoverano le pratiche di ricerca discutibili (QRP), come l'auto-plagiarismo (Martin 2013). Tuttavia, questi comportamenti si estendono al di là e al di fuori delle QRP. Soprattutto negli ultimi anni, sia i ricercatori che la stampa hanno riportato il fenomeno della manipolazione delle pubblicazioni scientifiche e della documentazione delle citazioni, con lo scopo di accrescere la credibilità scientifica degli autori o delle riviste, che, in molti casi può essere scambiata per un vantaggio personale ed economico (Biagioli et al. 2019, 2020a, 2020b, Chapman et al 2019, 2020a, 2020b, Chapman et al 2019). Mentre secondo Merton la maggiore ricompensa del ricercatore dovrebbe essere rappresentata dal conseguimento di una scoperta scientifica (Merton 1957), il risultato scientifico può attualmente avere un valore inferiore come “merce di scambio” che una pubblicazione su una rivista molto quotata e, in modo particolare, ottenere un numero di importante di citazioni. A tale scopo, ogni sorta di falsificazione e manipolazione è oggi indirizzata all'obiettivo di raggiungere, sia per gli autori che per le riviste, punteggi elevati e fornire una “patina” di prestigio, sebbene questo possa essere “una patina sottile che nasconde una base di metallo”<sup>2</sup>.

La Figura 2 illustra i punti chiave del ciclo di ricerca-pubblicazione, a livello dei quali i diversi attori - tipicamente il ricercatore, il revisore o il direttore di una rivista - possono compromettere o violare l'integrità della ricerca a proprio vantaggio. Le descrizioni delle fasi del ciclo (da A ad H) che seguono, comprendono i FFP, i QRP e le nuove forme di auto-promozione e falsificazione.

#### A. Scopo della ricerca, revisione della letteratura, ipotesi e progetto

Il ciclo di una ricerca inizia con un problema da risolvere e dovrebbe includere una revisione approfondita della letteratura esistente, per evitare la pubblicazione di articoli multipli o ridondanti (Smart 2017), per aumentare l'efficacia della ricerca stessa e garantire la corretta attribuzione di credito alle fonti.

<sup>2</sup>NdT. Frase intraducibile che si riferisce all'uso di ricoprire con uno strato sottile (patina) sculture di bronzo o altri metalli al duplice scopo di rendere le sculture più antiche di quanto siano e, in alcune occasioni, di mascherare il materiale povero (metallo) di cui erano fatte le sculture stesse. Si potrebbe più semplicemente rendere con “... fornire una falsa impressione di prestigio”



**Figura 2**

*Fasi critiche per assicurare l'integrità della ricerca e della pubblicazione: problematiche aggiuntive rispetto a fabbricazione, falsificazione e al plagio*

Va sottolineato che l'idea dei primi database citazionali nella letteratura scientifica fu di Eugene Garfield, fondatore dell'Istituto per l'Interscambio Scientifico (ISI), il quale propose l'utilizzo degli indici di citazione per evitare di produrre ricerche e pubblicazioni ridondanti (Garfield 1955). Ovviamente, la revisione della letteratura può modificare l'ipotesi iniziale.

### **B. Ricerca, sperimentazione e raccolta dei dati**

Documentare l'ipotesi e il progetto sperimentale, in particolare tenendo un registro degli esperimenti, previene che qualcuno in seguito usi proditoriamente i dati prodotti. La documentazione completa della metodologia sperimentale e dei risultati ottenuti garantisce la riproducibilità del risultato, attualmente uno dei motivi di preoccupazione in molti settori (Franca & Monserrat 2019)<sup>3</sup>. Redigere una documentazione scadente o superficiale si è rivelato un modello di comportamento coerente (e probabilmente intenzionale) in molti casi di cattiva condotta scientifica.

### **C. Analisi dei dati, verifica delle ipotesi, conservazione dei dati**

Le principali forme di cattiva condotta includono la fabbricazione e falsificazione dei dati, manipolare e confondere (trimming and cooking) i dati, mentre altri espedienti includono la manipolazione del p-value (p-hacking), l'omissione dei risultati negativi per

confermare la propria tesi (cherry picking) e la pratica di presentare un'ipotesi a posteriori sulla base dei risultati stessi, nota come HARKing (Head et al 2015, Murphy & Aguinis 2019, Raj et al. 2018, Kerr 1998).

Tale pratica sembra essere motivata dal desiderio di pubblicare risultati positivi ed interessanti; spesso viene condotta inconsciamente, come risultato di una auto-illusione (self-delusion), o di auto-conferma delle proprie tesi (confirmation bias)<sup>4</sup>.

### **D. Preparazione del manoscritto, che include i risultati, i riferimenti bibliografici, la paternità intellettuale, le affiliazioni, i finanziamenti, i riconoscimenti e le dichiarazioni sul conflitto di interessi**

Esistono diversi meccanismi attraverso cui è possibile ledere l'integrità della ricerca nell'elaborazione di un manoscritto che riporta risultati di una ricerca. La pubblicazione dovrebbe comprendere una descrizione completa ed accurata dei metodi utilizzati, dei dati e dei risultati ottenuti, evitando la falsificazione o la manipolazione delle immagini riferite agli esperimenti (Bik et al 2016, Bucci 2018, Cromey 2010, Koppers et al 2017). Il testo deve essere originale, non ripreso da altre fonti (evitare il plagiarismo, incluso l'auto-plagio senza dichiararlo) e non deve essere acquistato da "fabbriche di articoli" (Hvistendahl 2013)<sup>5</sup>. I riferimenti bibliografici devono essere utilizzati solo per documentare ricerche, idee e metodi correlati all'articolo che si sta scrivendo, e non per migliorare il curriculum scientifico di autori,

<sup>3</sup>NdT. Sulla ricerca riproducibile vedi anche "La Scienza Riproducibile" di M Vidali *Biochim Clin* 2020;44:386-96

<sup>4</sup>NdT. Fenomeni per cui lo scienziato pensa di agire in maniera scientifica anche se in realtà ha perso qualsiasi oggettività (self-delusion), e tende a conservare le proprie ipotesi anche in presenza di informazioni che le contraddicono (confirmation bias).

<sup>5</sup>NdT. Si riferisce alla pratica di far scrivere i propri articoli da qualcun altro, pagando per questo o addirittura di acquistare articoli pre-fabbricati.

riviste, istituzioni, e così via (Gasparyan 2015); gli autori citati devono soddisfare i requisiti prefissati dagli standard internazionali (evitare di inserire paternità intellettuali di “collegi onorari” oppure false, inesistenti o improprie) (Fong & Wilhite 2017, Teixeira da Silva & Dobranszki 2016). Anche le affiliazioni degli autori devono essere appropriate e veritiere (evitare affiliazioni false, inesistenti, o sponsorizzate) ed infine, la pubblicazione deve riportare i riconoscimenti completi ed accurati per coloro che hanno contribuito al lavoro scientifico e, se necessario, una dichiarazione sul conflitto di interessi.

### **E. Selezione della rivista di pubblicazione e presentazione**

Il manoscritto non dovrebbe essere presentato a riviste diverse contemporaneamente, ma dovrebbe essere selezionato il giornale più appropriato, sulla base del bacino di utenza più pertinente alla ricerca pubblicata. Le sedi inappropriate includono le cosiddette riviste “predatorie”, solo al fine avere il lavoro pubblicato (Butler 2013, Frandsen 2017). Inoltre, i ricercatori dovrebbero evitare la pratica del cosiddetto “salami science” (Huth 1986, Smart 2017), che consiste nel suddividere un singolo lavoro di ricerca in più articoli.

### **F. Processo editoriale e di revisione tra pari, incluse le fasi di revisione**

Negli ultimi anni sono emersi nuovi e preoccupanti comportamenti in questa fase del ciclo di ricerca. Alcuni autori senza scrupoli, se richiesti di indicare un revisore, hanno suggerito complici o reindirizzato la recensione a sé stessi, tramite l'utilizzo di indirizzi e-mail fittizi (Ferguson et al 2014, Haug 2015, Kulkarni 2016, Rivera 2019). L'esistenza di revisioni tra pari mendaci o auto-prodotte evidenzia i punti deboli dei sistemi di valutazione di molti editori. Dopo aver ricevuto i suggerimenti dei revisori, gli autori dovrebbero apportare correzioni tempestive e mirate, senza includere modifiche sostanziali volte a favorire sé stessi o altri (ad esempio aggiungendo auto-citazioni o citazioni per compiacere qualcun altro a favore di revisori o di riviste, su richiesta dei direttori del giornale; inoltre, non dovrebbero essere aggiunti altri autori, soprattutto attraverso la compravendita della paternità di pubblicazioni scientifiche). La revisione tra pari ha lo scopo di fornire una valutazione imparziale del manoscritto e non dovrebbe esercitare pressioni affinché gli autori citino i lavori del revisore (Thombs et al. 2015). I revisori dovrebbero astenersi dalla eliminazione dei concorrenti, dalla appropriazione di idee o risultati altrui al fine di poter vantare una priorità in una qualche scoperta scientifica. In questo ambito, i direttori dei giornali dovrebbero esercitare una attenta sorveglianza nella verifica degli autori, delle affiliazioni e dei revisori suggeriti, nonché promuovere

l'identità e la sicurezza delle proprie pubblicazioni (Bohannon 2015). In alcuni casi, i direttori stessi hanno perpetrato atti di cattiva condotta, facendo pressione sugli autori affinché citassero la propria o altre riviste, con l'intento di migliorarne l'Impact Factor™ (Chorus Waltman 2016, Fong & Wilhite 2017, Herteliu et al 2017, Hickman et al. 2019, Ioannidis 2015, Martin 2016, Wilhite & Fong 2012) o di instaurare una serie di citazioni reciproche con altri giornali (Davis 2012, Fister et al. 2016, Heneberg 2016). La creazione o l'utilizzo di falsi Impact Factor è considerato un illecito (Dadkhah et al 2017, Gutierrez et al 2015, Jalalian 2015, Xia & Smith 2018). Le decisioni editoriali di qualsiasi tipo dovrebbero basarsi sulla qualità e significatività della ricerca e non essere in alcun modo influenzate da opinioni personali.

### **G. Pubblicazione**

In generale, il processo di pubblicazione dovrebbe essere conforme alle norme etiche della comunità scientifica in tema di onestà intellettuale, trasparenza e responsabilità (Franca & Monserrat 2019). La pubblicazione scientifica rappresenta un contributo per i colleghi ricercatori e per lo sviluppo delle conoscenze e non dovrebbe essere progettata o realizzata come veicolo di un guadagno personale.

### **H. Utilizzo delle pubblicazioni per delineare la ricerca e il ricercatore**

Spesso, l'assegnazione delle risorse (incluse nomine, promozioni e finanziamenti) dipende dal numero di pubblicazioni e di citazioni ricevute, oltre che da altri parametri quantitativi e, soprattutto, da altri parametri qualitativi e dal parere di esperti. Se una pubblicazione e le citazioni sono state manipolate, non possono servire come parametri affidabili dell'attività individuale (o di un giornale o di un'istituzione) e dei risultati ottenuti. I singoli individui e i direttori delle riviste coinvolti nella manipolazione delle citazioni distorcono le loro individualità e il loro status e minano l'attendibilità della comunità scientifica. Tra le varie forme di cattiva condotta non si annoverano quindi solamente la frode e il plagio, ma anche vari epifenomeni di “giochi poco puliti” perpetrati per ottenere benefici, vantaggi personali ed economici.

## **RESPONSABILITÀ CONDIVISE**

**Esistono molti “stakeholder” responsabili del mantenimento dell'integrità della ricerca e nessun gruppo singolarmente è in grado di rettificare gli insuccessi nel mantenimento della integrità della ricerca.**

Il mantenimento dell'integrità della ricerca è una responsabilità condivisa. Ogni figura professionale ha il compito di individuare i meccanismi attraverso cui è possibile incorrere in fenomeni di cattiva condotta,

che possono essere differenti in base al rispettivo ruolo professionale.

Nella Tabella 1 viene fornito un elenco delle varie responsabilità professionali coinvolte nella

promozione dell'integrità nella ricerca scientifica all'interno del panorama dell'editoria accademica. Per ognuna di esse vengono riassunte le motivazioni pertinenti ed identificati i relativi "stakeholder".

**Tabella 1**

*Elenco delle responsabilità professionali*

Responsabilità	Ricercatori (autori, co-autori e revisori)	Editori (inclusi i comitati editoriali)	Istituzioni	Finanziatori	Fornitori di database
Revisione della letteratura esistente - Verificare la presenza di pubblicazioni Responsabilità - Garantire la corretta attribuzione del credito alle fonti	●	●			
Conferma della legittimità dei riferimenti bibliografici - Verificare se i lavori citati sono stati modificati o ritrattati - Verificare che i riferimenti siano rilevanti ed evitare la citazione di riferimenti bibliografici superflui - Mantenere un livello di autocitazione adeguato al settore o alla disciplina d'appartenenza	●	●			
Garantire l'origine dei dati sperimentali - Anche se molti casi di cattiva condotta sono intenzionali, la gestione negligente dei dati di partenza può causare l'uso accidentale di materiale inattendibile - Verificare la presenza di manipolazione delle immagini e di falsificazione dei dati	●	●			
Conferma della validità statistica - Verificare che tutte le variabili siano inserite nell'analisi statistica e che siano stati effettuati tutti i test statistici previsti - Quando possibile, confrontare i dati pubblicati con le fonti di terze parti, come i database dei risultati degli studi clinici	●	●			
Verifica dell'identità dell'autore e delle affiliazioni - Assicurare la veridicità dei nomi riportati nell'articolo, la correttezza delle affiliazioni e l'effettiva esistenza delle organizzazioni citate	●	●			
Rilevamento del plagio - Utilizzare sistemi d'analisi per implementare il riscontro di plagio		●			
Valutazione delle immagini - Fornire norme chiare su ciò che viene considerato manipolazione delle immagini - Avvalersi di esperti per la valutazione delle immagini prima della loro pubblicazione		●			

**Tabella 1**  
*Continua*

Responsabilità	Ricercatori (autori, co- autori e revisori)	Editori (inclusi i comitati editoriali)	Istituzioni	Finanziatori	Fornitori di database
Validazione dei contributi all'opera - Assicurarsi che gli autori elencati abbiano contribuito effettivamente alla ricerca - Fornire consulenza sui requisiti richiesti per la citazione di un autore, nei casi in cui il numero di autori per articolo sia cospicuo - Esaminare le paternità intellettuali di gruppo	●	●			
Eseguire una corretta revisione tra pari - Assicurarsi che la revisione paritaria non sia mendace o auto-prodotta - Verificare l'idoneità dei revisori suggeriti - Verificare eventuali conflitti di interesse - Identificare e sopprimere comportamenti coercitivi, ad esempio l'invito ad aggiungere ulteriori riferimenti bibliografici	●	●			
Verifica dell'identità e della validità della rivista - La sollecitazione alla sottomissione di un articolo potrebbe non provenire dalla rivista stessa, ma essere conseguente al furto d'identità della rivista o alla creazione di una rivista dal nome simile (predatory journals) - Evitare di sottomettere articoli, fare recensioni o partecipare ai comitati editoriali di riviste che non rispettano gli standard accademici vigenti - Identificare ed escludere proattivamente fonti false e scarsamente significative al momento della selezione dei contenuti e dell'indicizzazione dei dati	●	●			●
Utilizzo degli indicatori bibliometrici in modo responsabile - Utilizzare misurazioni statistiche appropriate e sospendere la valutazione in caso di riscontro di comportamenti impropri - Utilizzare le misurazioni statistiche in aggiunta, e non in alternativa, al processo decisionale - Preferire l'utilizzo di indicatori qualitativi e quantitativi multifattoriali - Considerare i vantaggi apportati da un sistema di valutazione ed il suo impatto sui ricercatori		●	●	●	●
Formazione dei ricercatori ed applicazione delle norme vigenti - Formare i ricercatori sulle competenze essenziali, incluse la revisione della letteratura, l'elaborazione dei manoscritti e la revisione tra pari - Fornire norme chiare in merito alla condotta appropriata, monitorare l'attività dei ricercatori ed adottare misure punitive ove opportuno - Essere responsabili nei confronti dei finanziatori e dei governi			●	●	

Alcune di queste responsabilità sono prettamente teoriche ed il grado con cui possono essere realizzate è variabile. L'uso di tecnologie, di sistemi di analisi e dati aggiuntivi possono contribuire alla risoluzione del problema in modo più efficiente. In alcuni casi, occorre considerare fattori esterni che influenzano la capacità degli individui di comportarsi secondo le loro responsabilità, come l'essere vittima di bullismo e discriminazione e pertanto, gran parte della responsabilità è anche di coloro che gestiscono l'ambiente nel quale l'attività di ricerca si svolge.

### IN CHE MODO LA TECNOLOGIA E I SISTEMI DI ANALISI DEI DATI POSSONO AIUTARE

**Nonostante la complessità del problema, sono già stati raggiunti numerosi progressi nell'ambito del monitoraggio dell'integrità nel sistema della ricerca scientifica.**

Ulteriori ottimizzazioni sono rese possibili dalla aumentata disponibilità dei dati, dallo sviluppo di recenti tecniche di analisi e dall'applicazione di nuovi algoritmi di "machine learning" (programmi di apprendimento automatico). Di seguito, sono riportate sei principali aree di miglioramento.

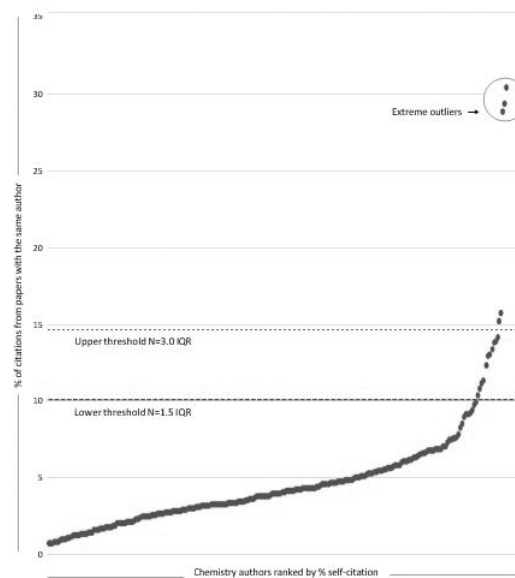
#### 1. Analisi delle autocitazioni

Gli indicatori relativi alle citazioni rappresentano un metodo per valutare quanto una ricerca scientifica abbia influenzato il panorama accademico, sulla base del numero di citazioni che sono incluse nei lavori successivi. Se integrata in un portfolio, come una rivista, un'istituzione o una regione, l'impatto di una ricerca nella comunità scientifica può essere misurato e confrontato tra pari al fine di evidenziare possibili differenze relative e l'andamento nel tempo delle prestazioni. Il tasso di autocitazione individuale o di gruppo (ad esempio riviste istituzionali, regioni) è stato un argomento di grande interesse a partire dagli anni '60 (Kaplan 1965); il dibattito su ciò che è considerato accettabile tiene conto di numerosi fattori legittimi e illegittimi.

In una recente pubblicazione (Szomszor et al. 2020), è stata condotta un'analisi sulla graduatoria annuale dei ricercatori maggiormente citati (Highly Cited Researchers™) nel 2019, per valutare il limite oltre al quale il tasso di autocitazione possa venir considerato eccessivo. In questo studio, i tassi di autocitazione individuale sono stati analizzati tramite l'utilizzo di rappresentazioni grafiche per comprendere la distribuzione del fenomeno in relazione al campo specifico e per evidenziare tassi di autocitazione insolitamente elevati. Un estratto del lavoro originale è mostrato nella Figura 3, la quale illustra la distribuzione delle autocitazioni (ovvero la percentuale di citazioni contenute in lavori dello stesso autore) in un campione di circa 250 autori appartenenti al campo della Chimica. Il grafico mostra un aumento costante per la maggior parte della

popolazione in studio, ma è osservabile un particolare incremento evidente alla fine della curva, che rappresenta tre autori con tassi di autocitazione insolitamente elevati. Le due rette orizzontali sono poste alle soglie di rilevamento standard degli outlier (1,5 e 3 volte l'intervallo interquartile a partire dal terzo quartile).

Questa tecnica, a differenza di altri studi (Ioannidis et al 2019) che suggeriscono l'uso dei percentili per identificare possibili manipolazioni, evidenzia la necessità di interpretare i dati nel contesto della disciplina d'appartenenza e del giudizio umano. Queste tecniche potrebbero essere applicate nell'ambito della revisione dei manoscritti, quando i tassi di autocitazione nei lavori inviati potrebbero essere rivisti in un contesto più ampio consentendo ai revisori di esprimere un giudizio informato ed opinioni costruttive. Le stesse tecniche di analisi sono ugualmente efficaci a livello delle riviste e potrebbero essere utilizzate dai comitati editoriali per monitorare il tasso di autocitazione della propria rivista e confrontarlo con le altre, con lo scopo di evitare potenziali problemi [ad esempio, la rimozione dell'Impact Factor di una rivista (Journal Impact Factor -JIF)].



**Figura 3**  
Distribuzione dei tassi di autocitazione per Highly Cited Researchers nel campo della Chimica.

#### 2. Individuare la manipolazione delle citazioni reciproche tra riviste

A partire dalla prima edizione nel 1975, il Journal Citation Reports (JCR) pubblica informazioni trasparenti circa il livello di autocitazione e di citazioni reciproche tra riviste, e di come questo fenomeno

influisca sulle misurazioni statistiche chiave (Garfield, 1975). Dal 2004, l'analisi dei dati relativi alla frequenza delle citazioni reciproche tra riviste e al loro impatto sul JIF di un determinato settore, ha permesso di rilevare le riviste caratterizzate da un JIF molto distorto. Queste riviste sono state successivamente rimosse (o soppresse) dall'elenco ufficiale del JCR. Nel 2011, con l'aggiunta di tecniche d'analisi più sofisticate, è stato individuato uno scambio strategico di citazioni tra riviste, una pratica comunemente nota appunto come "ammassamento di citazioni" (Heneberg, 2016).

Il concetto di cartello per le citazioni (citation cartel) (Davis 2012) è stato discusso nel 1999 in un lavoro di Franck (Franck 1999). L'autore ha identificato direttori e riviste che agivano di concerto utilizzando un mutuo scambio di citazioni per fare schizzare in alto l'IP delle loro riviste. Nonostante la difficoltà di individuare questi fenomeni con l'utilizzo di algoritmi (sia in termini di complessità computazionale che di disponibilità di algoritmi per la risoluzione della disambiguazione per gli autori, (ovvero per distinguere i casi di omonimia tra autori), un recente lavoro ispirato dalle scienze multidisciplinari (Fister et al. 2016) ha proposto la possibilità di rilevare queste manipolazioni in modo programmatico, ma tenendo conto che *"è possibile soltanto suggerire l'alta probabilità di incorrere in una cartello di citazioni reciproche; tuttavia, tale ipotesi deve essere confermata da un'analisi dettagliata"*. Un'analisi più approfondita (Chakraborty et al 2020) ha descritto le complessità associate a questa problematica, rappresentate in particolare dalla difficoltà di discriminare tale comportamento da altre strategie opportunistiche, quali l'eccessiva autocitazione, la coercizione, la citazione reciproca e la strategia "online queue"<sup>6</sup> (Martin 2016). Tuttavia, la collaborazione tra fornitori di database (che forniscono i dati necessari) ed editori (che possono essere sensibilizzati verso questo tipo di comportamento) potrebbe condurre ad un'analisi più elaborata ed immediata.

### 3. Rilevamento del plagiarismo

Un software per il riconoscimento del plagio è stato introdotto nel 1989 (Parker 1989) e, come molte altre analisi successive, è stato originariamente utilizzato in ambito scolastico per scoprire studenti che copiassero il lavoro di altri. La diffusa possibilità di accedere ai contenuti di molti articoli sul web, ha fatto aumentare in modo esponenziale la quantità di materiale potenzialmente "copiabile" e ciò ha portato all'introduzione di nuovi algoritmi in grado di confrontare una quantità molto elevata di testi. Tuttavia, il riscontro del plagio non consiste soltanto nell'individuazione in un testo di parti replicate da un altro testo, ma è associato a problematiche

complesse, come la distinzione tra plagio letterale ed intellettuale (Alzahrani et al. 2012), la sottile differenza tra parafrasi e plagio (Barrón-Cedeño et al 2013) e la difficoltà nell'individuare il plagio tra lingue diverse (Potthast et al 2010). Per approcciare queste problematiche, è stato proposto l'utilizzo di un sistema di rilevazione del plagio basato sulle citazioni e, come dichiarato da Gipp: *"... il pattern citazionale all'interno di un articolo ..... fornisce un'impronta semantica indipendente dalla lingua per la valutazione delle analogie"* (Gipp 2014). Eventualmente, il software anti-plagio dovrebbe essere adottato da qualsiasi linea editoriale per facilitare la rapida individuazione di eventuali similarità. In futuro, la sofisticazione degli algoritmi di analisi permetterà di individuare un numero sempre maggiore di casi riconducibili a questo tipo di cattiva condotta.

### 4. Manipolazione delle immagini

Il crescente riscontro di articoli contenenti immagini sospette registrato negli ultimi dieci anni (Bik et al. 2016) ha portato ad un aggiornamento del processo editoriale che includesse programmi per l'analisi delle immagini, e ci si aspetta ora che gli editori elaborino una chiara politica di cosa costituisce una manipolazione delle immagini. Le indagini condotte dagli esperti per il riconoscimento delle alterazioni operate sulle immagini includono la ricerca di segni identificativi di modifiche sospette, quali ad esempio l'utilizzo degli strumenti di ritaglio, l'utilizzo di filtri per il miglioramento dell'immagine (luminosità, regolazione del contrasto e del colore), l'espansione di parti delle immagini, la clonazione e la falsificazione.

La necessità di ripulire le immagini per la pubblicazione è attualmente sotto esame e potrebbe essere scoraggiata a favore della pubblicazione di versioni meno attraenti ma più autentiche dei risultati sperimentali. Con ogni probabilità, l'utilizzo di programmi di apprendimento automatico ed altri miglioramenti (Bayar & Stamm 2018, Bucci 2018, Cicconet et al. 2020, Koppers et al 2017) fornirà strumenti più sofisticati per espandere il loro utilizzo al di fuori del settore biomedico, che è l'attuale area di interesse.

### 5. Attività di revisione anomala

Una ulteriore area nella quale i programmi di analisi possono essere utilizzati dai comitati editoriali è l'individuazione di eventuali attività di revisione sospette, come la creazione di account fittizi per la revisione dei propri articoli o di articoli redatti da collaboratori. Questi software si basano sulla raccolta e l'analisi di specifici dati durante la sottomissione di un articolo e il processo di revisione tra pari, al fine di segnalare attività che richiedono ulteriori

<sup>6</sup>NdT. Si definisce "online queue" la presenza nei siti delle riviste di una serie insolitamente lunga di articoli pre-pubblicati online, prima della stampa cartacea

approfondimenti da parte di un gruppo revisori o del comitato editoriale. Tali accorgimenti potrebbero includere il riscontro di autori e revisori appartenenti alla medesima rete di contatti o in prossimità geografica, tempi di revisione brevi o il reclutamento di revisori raccomandati dall'autore che non possiedono indirizzi e-mail istituzionali. L'utilizzo della piattaforma ScholarOne™ consente ad editori e comitati editoriali di accedere ad approfondimenti in merito, tramite lo strumento "Rilevamento di Attività Sospette" (Unusual Activity Detection). Nel 2016 è stata condotta un'analisi più dettagliata dei comitati editoriali e dei revisori (Sikdar et al. 2016) che analizza indicatori più specifici relativi alla frequenza delle revisioni, all'auto-assegnazione da parte dei direttori delle riviste, all'eterogeneità degli articoli recensiti ed altro. Tali osservazioni offrono interessanti possibilità per migliorare l'attività di analisi delle revisioni e, di conseguenza, aiutare gli editori a difendersi da fenomeni di cattiva condotta nell'ambito del processo revisionale.

La problematica relativa alla verificabilità dell'identità dei revisori (ad esempio per prevenire le false revisioni) può essere risolta attraverso l'utilizzo di piattaforme open peer-review, come Publons™. Questi siti consentono di registrare l'attività di revisione e di fornire ai comitati editoriali indicazioni circa la legittimità dei ricercatori. L'associazione dei dati disponibili sulla piattaforma agli identificativi dei ricercatori, ad esempio attraverso l'integrazione con Web of Science ResearcherID o ORCID, costituisce una potenziale fonte di informazioni per verificare automaticamente eventuali conflitti d'interesse e l'idoneità dei revisori sulla base dell'appartenenza ad un analogo campo di ricerca.

## 6. Strumenti di creazione dei riferimenti bibliografici

Durante la preparazione di un articolo, il ricercatore può utilizzare una grande quantità di informazioni che lo possano assistere nella selezione dei riferimenti appropriati. I software per la gestione dei riferimenti bibliografici, come EndNote e Zotero, possono avvalersi di sistemi di indicizzazione per determinare l'eventuale ritrattazione di un articolo e fornire informazioni in merito alla qualità della rivista, come la tipologia di revisione tra pari o l'indice di trasparenza (Nosek et al. 2015).

Per quanto riguarda il fenomeno dell'autocitazione, sia a livello individuale che della rivista, potrebbero essere utilizzati i sistemi di indicizzazione per verificare i riferimenti bibliografici citati e segnalare quelli che presentano tassi di autocitazione atipici o anche di monitorare se l'articolo che si sta preparando è caratterizzato da un tasso di auto-citazione che rientra nell'intervallo di riferimento accettabile per la disciplina d'appartenenza.

## COSA HA IN SERBO IL FUTURO?

**Questo articolo ha evidenziato gli epifenomeni sviluppatasi nel contesto dell'attività di ricerca e pubblicazione, la loro associazione alle problematiche relative all'integrità della ricerca e la necessità di imporre nuovi standard di monitoraggio oltre a quelli della triade tradizionale: fabbricazione, falsificazione e plagio (FFP).**

Dalla descrizione delle attività degli stakeholder e delle loro rispettive responsabilità, emerge con chiarezza che è necessario uno sforzo collettivo e proattivo per affrontare le molteplici possibilità di cattiva condotta.

Esistono diversi orientamenti in grado di influenzare il percorso futuro. La libera circolazione della ricerca impone una maggiore trasparenza, che, a sua volta, influisce sull'aspettativa di riproducibilità in termini di rigore metodologico e di visibilità dei dati. Questo fenomeno rafforzerà la capacità di identificare i comportamenti che concorrono ad una cattiva condotta scientifica durante le fasi di ricerca, analisi e pubblicazione.

L'aumento della pubblicazione degli articoli in modalità "open access", un risultato inevitabile dovuto alla pressione dei finanziatori per rendere accessibile ad un vasto pubblico la ricerca scientifica, modificherà le modalità di distribuzione dei fondi destinati alle pubblicazioni nonché il flusso di risorse tra finanziatori, istituzioni ed editori e la selezione della sede di pubblicazione. Per quanto riguarda la sede di pubblicazione, diventerà responsabilità dei finanziatori e delle istituzioni (che si occupano della distribuzione dei fondi alla ricerca) avere un approccio proattivo in tal senso.

Alcune organizzazioni si sono già attivate su questo fronte, come l'Australian Research Council, la quale valuta soltanto gli articoli pubblicati su riviste incluse in un apposito elenco, delineato dal programma nazionale di valutazione della ricerca, l'Excellence in Research for Australia (ERA). L'elenco è stato creato dopo consultazione con gli organi competenti ed esperti del settore.

I fornitori di database contribuiscono a garantire che sia presente una maggiore trasparenza dei criteri di valutazione (come quelli utilizzati per il database Web of Science Core Collection) e sostenendo progetti comuni, come la Platform for Responsible Editorial Policies (Horbach et al 2020), per facilitare ricercatori e valutatori nell'individuare riviste che sostengono i principi dell'integrità della ricerca.

Un tratto fondamentale che si ritrova nei diversi comportamenti fraudolenti identificati in questo articolo è costituito dal travisamento di identità. La possibilità di consultare i profili pubblici dei ricercatori nell'ambito dell'attività di pubblicazione e di revisione fornisce informazioni utili per un utile riscontro.

Tuttavia, un'ulteriore ottimizzazione nel garantire la verificabilità potrebbe essere offerta dalle tecnologie Blockchain. La piattaforma Blockchain (Sherman et al. 2019) utilizza tecniche crittografiche per creare un archivio pubblico che può essere utilizzato per verificare l'identità dei revisori e tracciare le transazioni. Pertanto, potrebbe essere utilizzata per verificare la veridicità delle identità e delle pubblicazioni ed incentivare un rapporto di fiducia tra le parti, ad esempio nel contesto del processo di revisione tra pari (Mackey et al. 2019).

Infine, l'individuazione di nuovi sistemi di valutazione della ricerca e la revisione di quelli preesistenti, dovrebbe mettere in discussione l'utilizzo degli indicatori bibliometrici tradizionali.

Qualsiasi sia la situazione nella quale essi sono impiegati, si possono verificare potenziali alterazioni dei comportamenti (spostamento degli obiettivi) ed anche incentivare processi che possono minare l'integrità della ricerca.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Alzahrani, S. M., Salim, N., & Abraham, A. (2012). Understanding plagiarism linguistic patterns, textual features, and detection methods. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part C (Applications and Reviews)*, 42(2), 133–149. <https://doi.org/10.1109/tsmcc.2011.2134847>
- Ayala, F. J. (1994). On the scientific method, its practice and pitfalls. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 16(2), 205-240. <https://www.jstor.org/stable/23331738>
- Barrón-Cedeño, A., Vila, M., Martí, M., & Rosso, P. (2013). Plagiarism meets paraphrasing: Insights for the next generation in automatic plagiarism detection. *Computational Linguistics*, 39(4), 917–947. [https://doi.org/10.1162/coli\\_a\\_00153](https://doi.org/10.1162/coli_a_00153)
- Bayar, B. & Stamm, M. C. (2018). Constrained Convolutional Neural Networks: A New Approach Towards General Purpose Image Manipulation Detection. *IEEE Transactions on Information Forensics and Security*, 13(11), 2691-2706, <https://doi.org/10.1109/TIFS.2018.2825953>
- Biagioli, M., Kenney, M., Martin, B., & Walsh, J. (2019). Academic misconduct, misrepresentation, and gaming. *Research Policy*, 48(2): 401-413. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048733318302658>
- Biagioli, M. (2020a). Fraud by numbers: Metrics and the new academic misconduct. *Los Angeles Review of Books*, September 7, 2020. <https://www.lareviewofbooks.org/article/fraud-by-numbers-metrics-and-the-new-academic-misconduct/>
- Biagioli, M., & Lippman, A. (eds.) (2020b). *Gaming the metrics: Misconduct and manipulation in academic research*. Cambridge, MA: MIT Press. <https://mitpress.mit.edu/books/gaming-metrics>
- Bik, E. M., Cavadevall, A., Fang, F. C. (2016). The prevalence of inappropriate image duplication in biomedical research publications. *mBio*, 7(3), article number e00809-16. <https://mbio.asm.org/content/7/3/e00809-16>
- Bohannon, J. (2015). How to hijack a journal. *Science*, 350(6263), 903-905. <https://www.sciencemag.org/news/2015/11/feature-how-hijack-journal>
- Bucci, E. M. (2018). Automatic detection of image manipulations in the biomedical literature. *Cell Death & Disease*, 9, article number 400. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0430-3>
- Butler, D. (2013). Sham journals scam authors. *Nature*, 495(7442), 421-422. <https://www.nature.com/news/sham-journals-scam-authors-1.12681>
- Chakraborty, J., Pradhan, D. K., & Nandi, S. (2020). On the identification and analysis of citation pattern irregularities among journals. *Expert Systems*, article number e12561. <https://doi.org/10.1111/exsy.12561>
- Chapman, C. A., Bicca-Marques, J. C., Calvignac-Spencer, S., Fan, P. F., Fashing, P. J., Gogarten, J., Guo, S. T., Hemingway, C. A., Leendertz, F., Li, B. G., Matsuda, I., Hou, R., Serio-Silva, J. C., & Stenseth, N. C. (2019). Games academics play and their consequences: how authorship, h-index and journal impact factors are shaping the future of academia. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences*, 286(1916), article number 20192047. <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rspb.2019.2047>
- Chorus, C., & Waltman, L. (2016). A large-scale analysis of impact factor biased journal self-citations. *PLoS ONE*, 11(8), article number e0161021. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161021>
- Cicconet, M., Elliott, H., Richmond, D.L., Wainstock, D. & Walsh, M. Image Forensics: Detecting duplication of scientific images with manipulation-invariant image similarity. [arXiv:1802.06515v3](https://arxiv.org/abs/1802.06515v3), Mar 2020.
- Cromey, D. W. (2010). Avoiding twisted pixels: Ethical guidelines for the appropriate use and manipulation of scientific digital images. *Science and Engineering Ethics*, 16(4), 639-667. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11948-010-9201-y>
- Dadkhah, M., Borchardt, G., Lagzian, M., Bianciardi, G. (2017). Academic journals plagued by bogus impact factors. *Publishing Research Quarterly*, 33(2): 183-187. <https://doi.org/10.1007/s12109-017-9509-4> <https://link.springer.com/article/10.1007/s12109-017-9509-4>
- Davis, P. (2012). The emergence of a citation cartel. *The Scholarly Kitchen*, April 10, 2012 <https://scholarlykitchen.sspnet.org/2012/04/10/emergence-of-a-citation-cartel/>
- Edwards, M. A., & Roy, S. (2017). Academic research in the 21st century: Maintaining scientific integrity in a climate of perverse incentives and hypercompetition. *Environmental Engineering Science*, 34(1), 51-61. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ees.2016.0223>
- Fanelli, D. (2009). How many scientists fabricate and falsify research? A systematic review and meta-analysis of survey data. *PLoS ONE*, 4(5), article number e5738. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005738>
- Fanelli, D., Costas, R., & Larivière, V. (2015). Misconduct policies, academic culture and career stage, not gender or pressures to publish, affect scientific integrity. *PLoS ONE*, 10(6): article number e0127556 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127556>
- Fang, F. C., Steen R. G., & Casadevall, A. (2012). Misconduct accounts for the majority of retracted scientific publications. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 109(42), 17028-17033. <https://www.pnas.org/content/109/42/17028>
- Ferguson, C., Marcus, A., & Oransky, I. (2014). Publishing: the peer review scam. *Nature*, 515(7528),

- 480-482. <https://www.nature.com/news/publishing-the-peer-review-scam-1.16400>
- Fister, I., Fister, I., & Perc, M. (2016). Toward the discovery of citation cartels in citation networks. *Frontiers in Physics*, 4, article number 49. <https://doi.org/10.3389/fphy.2016.00049>
  - Fong, E. A., & Wilhite A. W. (2017). Authorship and citation manipulation in academic research. *PLoS ONE*, 12(12), article number e0187394. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187394>
  - Franca, T. F. A., & Monserrat, J. M. (2019). Reproducibility crisis, the scientific method, and the quality of published studies: Untangling the knot. *Learned Publishing*, 32(4), 406-408. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/leap.1250?af=R>
  - Franck, G. (1999). Scientific communication: a vanity fair? *Science*, 286(5437), 53-55. <https://doi.org/10.1126/science.286.5437.53>
  - Frandsen, T. F. (2017). Are predatory journals undermining the credibility of science? A bibliometric analysis of citers. *Scientometrics*, 113(3), 1513-1528. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11192-017-2520-x>
  - Garfield, E. (1955). Citation indexes for science: a new dimension in documentation through association of ideas. *Science*, 122(3159), 108-111. <https://science.sciencemag.org/content/122/3159/108>
  - Garfield, E. (1975). Preface and Introduction to *Journal Citation Reports - Vol. 9 of the Science Citation Index*, 1975.
  - Gasparyan, A. Y., Yessirkepov, M., Voronov, A. A., Gerasimov, A. N., Kostyukova, E. I., & Kitas, G. D. (2015). Preserving the integrity of citations and references by all stakeholders of science communication. *Journal of Korean Medical Science*, 30(11):1545-1552. <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2015.30.11.1545>
  - Gipp, B. (2014). *Citation-based Plagiarism Detection: Detecting Disguised and Cross-language Plagiarism using Citation Pattern Analysis*. Wiesbaden: Springer Vieweg. <https://www.springer.com/gp/book/9783658063931>
  - Gross, C. (2016). Scientific misconduct. *Annual Review of Psychology*, 67, 693-711. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-psych-122414-033437>
  - Gutierrez, F. R. S., Beall, J., & Forero, D. A. (2015). Spurious alternative impact factors: The scale of the problem from an academic perspective. *BioEssays*, 37(5): 474-476. [https://www.academia.edu/35963518/Spurious\\_alternative\\_impact\\_factors\\_The\\_scale\\_of\\_the\\_problem\\_from\\_an\\_academic\\_perspective](https://www.academia.edu/35963518/Spurious_alternative_impact_factors_The_scale_of_the_problem_from_an_academic_perspective)
  - Haug, C. J. (2015). Peer-review fraud: Hacking the scientific publication process. *New England Journal of Medicine*, 373(25): 2393-2395. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp1512330>
  - Head, M. L., Holman, L., Lanfear, R., Kahn, A. T. & Jennions, M. D. (2015). The extent and consequences of p-hacking in science. *PLoS Biology*, 13(3), article number e1002106. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002106>
  - Heneberg, P. (2016). From excessive journal self-cites to citation stacking: Analysis of journal self-citation kinetics in search for journals, which boost their scientometric indicators. *PLoS ONE*, 11(4), article number e0153730. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153730>
  - Herteliu, C. Ausloss, M., Ileanu, B. V., Rotundo, G., & Andrei, T. (2017). Quantitative and qualitative analysis of editor behaviour through potentially coercive citations. *Publications*, 5(2), article number 15. <https://www.mdpi.com/2304-6775/5/2/15>
  - Hicks, D., Wouters, P., Waltman, L., de Rijcke, S., & Rafols, I. (2015). Bibliometrics: The Leiden Manifesto for research metrics. *Nature*, 520(7548), 429-431. <https://doi.org/10.1038/520429a>
  - Hickman, C. F., Fong, E. A., Wilhite, A. W., & Lee, Y. (2019). Academic misconduct and criminal liability: Manipulating academic journal impact factors. *Science and Public Policy*, 46(5), 661-667. <https://academic.oup.com/spp/article-abstract/46/5/661/5488509?redirectedFrom=fulltext>
  - Horbach, S. P. J. M., Hepkema, W. M., & Halffman, W. (2020). The Platform for Responsible Editorial Policies: An initiative to foster editorial transparency in scholarly publishing. *Learned Publishing*, 33(3), 340-344. <https://doi.org/10.1002/leap.1312>
  - Huth, E. J. (1986). Irresponsible authorship and wasteful publication. *Annals of Internal Medicine*, 104(2):257-259. <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-104-2-257>
  - Hvistendahl, M. (2013). China's publication bazaar. *Science*, 342(6162), 1035-1039. <https://science.sciencemag.org/content/342/6162/1035>
  - Ioannidis, J. P. A. (2015). A generalized view of self-citation: Direct, co-author, collaborative, and coercive induced self-citation. *Journal of Psychosomatic Research*, 78(1), 7-111. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022399914003882>
  - Ioannidis, J. P. A., Baas, J., Klavans, R., & Boyack, K. W. (2019). A standardized citation metrics author database annotated for scientific field. *PLoS Biology*, 17(8), article number e3000384. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000384>
  - Jalalian, M. (2015). The story of fake impact factor companies and how we detected them, *Electronic Physician*, 7(2): 1069-1072, 2015. <http://www.ephysician.ir/index.php/browse-issues/2015/2/173-1069-1072>
  - Kaplan, N. (1965). The norms of citation behavior: Prolegomena to the footnote. *American Documentation*, 16(3), 179-184. <https://doi.org/10.1002/asi.5090160305>
  - Kerr, N. L. (1998). HARKING: Hypothesizing After the Results are Known. *Personality and Social Psychology Review*, 2(3), 196-217. [https://doi.org/10.1207/s15327957pspr0203\\_4](https://doi.org/10.1207/s15327957pspr0203_4)
  - Koppers, L., Wormer, H., & Ickstadt, K. (2017). Towards a systematic screening tool for quality assurance and semiautomatic fraud detection for images in the life sciences. *Science and Engineering Ethics*, 23(4), 1113-1128. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11948-016-9841-7>
  - Kulkarni, S. (2016). What causes peer review scams and how can they be prevented? *Learned Publishing*, 29(3): 211-213. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/leap.1031>
  - Lock, S. (1994). Research misconduct: a brief history and a comparison. *Journal of Internal Medicine*, 235(2), 123-127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1994.tb01045.x>
  - Mackey, T. K., Shah, N., Miyachi, K., Short, J., & Clauson, K. (2019). A framework proposal for Blockchain-based scientific publishing using shared governance. *Frontiers in Blockchain*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbloc.2019.00019>
  - Martin, B. R. (2013). Whither research integrity? Plagiarism, self-plagiarism and coercive citation in an age of research assessment. *Research Policy*, 42(5), 1005-1014. <https://www.sciencedirect.com/>

- science/article/abs/pii/S004873331300067X
- Martin, B. R. (2016). Editors' JIF-boosting stratagems: Which are appropriate and which not? *Research Policy*, 45(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2015.09.001>
  - Matosin, N., Frank, E., Engel, M., Lum, J. S., & Newell, K. A. (2014). Negativity towards negative results: a discussion of the disconnect between scientific worth and scientific culture. *Disease Models & Mechanisms*, 7(2), 171–173. <https://doi.org/10.1242/dmm.015123>
  - Merton, R. K. (1942). Science and technology in a democratic order. *Journal of Legal and Political Sociology*, 1, 115-126.
  - Merton, R. K. (1957). Priorities in scientific discovery: a chapter in the sociology of science. *American Sociological Review*, 22(6), 635-659. <https://www.jstor.org/stable/2089193?origin=crossref>
  - Murphy, K. R., & Aguinis, H. (2019). HARKing: How badly can cherry-picking and question trolling produce bias in published results. *Journal of Business and Psychology*, 34(1), 1-17. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10869-017-9524-7>
  - Nosek, B. A., Alter, G., Banks, G. C., Borsboom, D., Bowman, S. D., Breckler, S. J., Buck, S., Chambers, C. D., Chin, G., Christensen, G., Contestabile, M., Dafoe, A., Eich, E., Freese, J., Glennerster, R., Goroff, D., Green, D. P., Hesse, B., Humphreys, M., ... Yarkoni, T. (2015). Promoting an open research culture. *Science*, 348(6242), 1422–1425. <https://doi.org/10.1126/science.aab2374>
  - Parker, A., & Hamblen, J. O. (1989). Computer algorithms for plagiarism detection. *IEEE Transactions on Education*, 32(2), 94–99. <https://doi.org/10.1109/13.28038>
  - Pascal, C. B. (1999). The history and future of the office of research integrity: Scientific misconduct and beyond. *Science and Engineering Ethics*, 5(2), 183–198. <https://doi.org/10.1007/s11948-999-0008-7>
  - Potthast, M., Barrón-Cedeño, A., Stein, B., & Rosso, P. (2010). Cross-language plagiarism detection. *Language Resources and Evaluation*, 45(1), 45–62. <https://doi.org/10.1007/s10579-009-9114-z>
  - Pulverer, B. (2015). When things go wrong: Correcting the scientific record. *The EMBO Journal*, 34(20), 2483–2485. <https://doi.org/10.15252/embj.201570080>
  - Raj, A. T., Patil, S., Sarode, S., & Salameh, Z. (2018). P-hacking: a wake-up call for the scientific community. *Science and Engineering Ethics*, 24(6), 1813-1814. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11948-017-9984-1>
  - Rivera, H. (2019). Fake peer review and inappropriate authorship are real evils. *Journal of Korean Medical Science*, 34(2): article number UNSP e6. <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2019.34.e6>
  - Sherman, A. T., Javani, F., Zhang, H., & Golaszewski, E. (2019). On the origins and variations of Blockchain technologies. *IEEE Security & Privacy*, 17(1), 72–77. <https://doi.org/10.1109/msec.2019.2893730>
  - Sikdar, S., Marsili, M., Ganguly, N., & Mukherjee, A. (2016). Anomalies in the peer-review system: A case study of the *Journal of High Energy Physics*. *Proceedings of the 25th ACM International on Conference on Information and Knowledge Management. CIKM'16: ACM Conference on Information and Knowledge Management*, 2245-2250. <https://doi.org/10.1145/2983323.2983675>
  - Smart, P. (2017). Redundant publication and salami slicing: the significance of splitting data. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 59(8), 775. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dmcn.13485>
  - Szomszor, M., Pendlebury, D.A. & Adams, J (2020). How much is too much? The difference between research influence and self-citation excess. *Scientometrics*, 123(2), 1119–1147. <https://doi.org/10.1007/s11192-020-03417-5>
  - Teixeira da Silva, J. A. T., & Dobranszki. (2016). Multiple authorship in scientific manuscripts: Ethical challenges, ghost and guest/gift authorship, and the cultural/disciplinary perspective. *Science and Engineering Ethics*, 22(5), 1457-1472. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11948-015-9716-3>
  - Thombs, B. D., Levis, A. W., Razykov, I., Syamchandra, A., Leentjens, A. F. G., Levenson, J. L., & Lumley, M. A. (2015). Potentially coercive self-citation by peer reviewers: A cross-sectional study. *Journal of Psychosomatic Research*, 78(1), 1-6. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S022399914003468>
  - Turnbull, H.W. ed., 1959. *The Correspondence of Isaac Newton: 1661-1675, Volume 1*, London, UK: Published for the Royal Society at the University Press. p. 416
  - Wilhite, A. W., & Fong, E. A. (2012). Coercive citation in academic publishing. *Science*, 335(6068), 542-543. <https://science.sciencemag.org/content/335/6068/542>
  - Xia, J., & Smith, M. P. (2018). Alternative journal impact factors in open access publishing. *Learned Publishing*, 31(4), 403-411. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/leap.1200>
  - Zhang, L. & Siversten, G. (2020). For China's ambitious research reforms to be successful, they will need to be supported by new research assessment infrastructures. *LSE Impact Blog* <https://blogs.lse.ac.uk/impactofsocialsciences/2020/06/11/for-chinas-ambitious-research-reforms-to-be-successful-they-will-need-to-be-supported-by-new-research-assessment-infrastructures/>
  - Zuckerman, H. (2020). Is “the time ripe” for quantitative research on misconduct in science? *Quantitative Science Studies*, 1(3), 945-958. [https://www.mitpressjournals.org/doi/full/10.1162/qss\\_a\\_00065](https://www.mitpressjournals.org/doi/full/10.1162/qss_a_00065)

## Appendice

Dichiarazioni e linee guida sul tema dell'integrità della ricerca, della cattiva condotta nella ricerca e dell'etica nell'ambito dell'editoria accademica e della ricerca scientifica. Le più recenti sono elencate per prime.

- "Scientific Integrity Principles and Best Practices: Recommendations from a Scientific Integrity Consortium" (2020) Kretser, A. et al., *Science and Engineering Ethics*, 25, 327-355. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11948-019-00094-3>
- "Working with Research Integrity – Guidance for Research Performing Organisations: The Bonn PRINTEGER Statement" (2018) Forsberg, E.-M. et al., *Science and Engineering Ethics*, 24, 1023–1034. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11948-018-0034-4>
- Association for Computing Machinery (ACM). "ACM Code of Ethics and Professional Conduct" (2018) <https://www.acm.org/code-of-ethics>
- World Economic Forum. "Code of Ethics, Young Scientist" (2018) [http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_Code\\_of\\_Ethics.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_Code_of_Ethics.pdf)
- All European Academies (Allea). "The European code of conduct for research integrity" (2017) <https://allea.org/code-of-conduct/>
- American Association for the Advancement of Science (AAAS). "The Brussels Declaration: Ethics and Principles for Science & Society Policy-Making" (2017) <https://www.knaw.nl/nl/actueel/nieuws/BrusselsDeclaration.pdf>
- American Psychological Association (APA) "Ethical Principles of Psychologists and Code of Conduct" (2017). <https://www.apa.org/ethics/code>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2017). *Fostering Integrity in Research*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://www.nap.edu/catalog/21896/fosteringintegrity-in-research>
- Research Councils UK (RCUK). "RCUK Policy and Guidelines on Governance of Good Research Conduct" (2017) <https://www.ukri.org/files/legacy/reviews/grc/rcuk-grp-policy-and-guidelines-updated-apr-17-2-pdf/>
- UK Royal Society. "The Royal Society's research integrity statement" (2017) <https://royalsociety.org/media/policy/Publications/2017/royal-societyresearch-integrity-statement-09-10-2017.pdf>
- Engineers Canada and Canadian Engineering Qualifications Board. "Public Guideline on the code of ethics. Engineers Canada" (2016) [https://engineerscanada.ca/sites/all/themes/roots\\_book/lib/savetopdf.php?nid=5358](https://engineerscanada.ca/sites/all/themes/roots_book/lib/savetopdf.php?nid=5358)
- World Conference on Research Integrity (WCRI). "Montreal Statement on Research Integrity in Cross-Boundary Research Collaborations" (2013) <https://wcrif.org/montreal-statement/file>
- Science Council of Japan (SCJ). "Code of Conduct for Scientists" (2013) <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-s3e-1.pdf>
- São Paulo Research Foundation (FAPESP) "Code of Good Scientific Practice" (2012). [https://fapesp.br/boaspraticas/FAPESP-Code\\_of\\_Good\\_Scientific\\_Practice\\_jun2012.pdf](https://fapesp.br/boaspraticas/FAPESP-Code_of_Good_Scientific_Practice_jun2012.pdf)
- World Conference on Research Integrity (WCRI). Singapore Statement on Research Integrity (2010) <https://wcrif.org/documents/327-singaporestatement-a4size/file>
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) and Global Science Forum. "Best Practices for Ensuring Scientific Integrity and Preventing Misconduct" (2007) <http://www.oecd.org/science/inno/40188303.pdf>
- US Health and Human Services, Office of Research Integrity (ORI). "Introduction to the Responsible Conduct of Research" (2007) <https://ori.hhs.gov/sites/default/files/2018-04/rcrintro.pdf>
- Committee on Publication Ethics (COPE) <https://publicationethics.org/>
- International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Recommendations for the Conduct Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (2019) <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>
- Platform for Responsible Editorial Policies (PREP) <https://www.responsiblejournals.org/>
- "Statement on Publication Ethics for Editors and Publishers" (2016). Gasparyan, A. Y., et al., *Journal of Korean Medical Science*, 31(9), 1351-1354. <https://jkms.org/DOLx.php?id=10.3346/jkms.2016.31.9.1351>

## Il Percorso Comune di Formazione per Specialisti in Medicina di Laboratorio secondo la Direttiva Europea 2013/55/EC (Il riconoscimento delle qualifiche professionali)

**Gijsbert Wieringa<sup>1</sup>, Josep Queraltó<sup>2</sup>, Evgenija Homšak<sup>3</sup>, Nuthar Jassam<sup>1</sup>, Etienne Cavalier<sup>4</sup>, Dobrin Svinarov<sup>5</sup>, Jasna L Krleža<sup>6</sup>, Spyroula Christou<sup>7</sup>, Richard Pikner<sup>8</sup>, Trine Rennebod Larsen<sup>9</sup>, Karel Tomberg<sup>10</sup>, Anna Linko-Parvinen<sup>11</sup>, Vincent Sapin<sup>12</sup>, Hannsjorg Baum<sup>13</sup>, Christos Kroupis<sup>14</sup>, Zsuzsa Bagoly<sup>15</sup>, Sean Costelloe<sup>16</sup>, Laura Sciacovelli<sup>17</sup>, Janis Stasulans<sup>18</sup>, Dalius Vitkus<sup>19</sup>, Danielle Meunier<sup>20</sup>, Bogdan Solnica<sup>21</sup>, Henrique Reguengo<sup>22</sup>, Cristina Mambet<sup>23</sup>, Gustav Kovac<sup>24</sup>, Blaž Krhin<sup>25</sup>, Mats Ohlson<sup>26</sup>, Gerald Buhagiar<sup>27</sup>, Ana-Maria Simundic<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Brussels/Milan, Belgium/Italy

<sup>2</sup>Spanish Society for Clinical Biochemistry and Molecular Pathology, Madrid, Spain

<sup>3</sup>European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Via Carlo Farini 81, 20159 Milan, Italy

<sup>4</sup>Royal Belgian Society of Laboratory Medicine, Brussels, Belgium

<sup>5</sup>Bulgarian Society of Clinical Laboratory, Sofia, Bulgaria

<sup>6</sup>Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, Zagreb, Croatia

<sup>7</sup>Greek Society of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, Athens, Greece

<sup>8</sup>Czech Society of Clinical Biochemistry, Prague, Czech Republic

<sup>9</sup>Danish Society of Clinical Chemistry, Horsens, Denmark

<sup>10</sup>Estonian Society of Laboratory Medicine, Tartu, Estonia

<sup>11</sup>Finnish Society of Clinical Chemistry, Helsinki, Finland

<sup>12</sup>French Society of Clinical Biology, Paris, France

<sup>13</sup>German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Bonn/Berlin, Germany

<sup>14</sup>Greek Society of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, Athens, Greece

<sup>15</sup>Hungarian Society of Laboratory Medicine, Debrecen, Hungary

<sup>16</sup>Association of Clinical Biochemists in Ireland, Dublin, Ireland

<sup>17</sup>The Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology, Milan, Italy

<sup>18</sup>Latvian Society of Laboratory Specialists, Riga, Latvia

<sup>19</sup>Lithuanian Society of Laboratory Medicine, Vilnius, Lithuania

<sup>20</sup>Luxembourg Society of Clinical Biology, Luxembourg, Luxembourg

<sup>21</sup>Polish Society for Laboratory Diagnostics, Warsaw, Poland

<sup>22</sup>Portuguese Society of Clinical Chemistry, Genetics and Laboratory Medicine, Porto, Portugal

<sup>23</sup>Romanian Association of Laboratory Medicine, Bucharest, Romania

<sup>24</sup>Slovak Society of Clinical Biochemistry, Bratislava, Slovakia

<sup>25</sup>Slovenian Association for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Ljubljana, Slovenia

<sup>26</sup>Swedish Society for Clinical Chemistry, Stockholm, Sweden

<sup>27</sup>Department of Pathology, Mater Dei Hospital, Valetta, Malta

**Traduzione a cura di Jasmine Turkman e Paolo Zaupa (Scuola di Specialità in Patologia Clinica e Biochimica Clinica, Università di Padova)**

*This is the Italian translation of A proposed common training framework for specialists in laboratory medicine under EU directive 2013/55/EC (The recognition of professional qualifications) Clin Chem Lab Med 2020 doi: 10.1515/cclm-2020. Biochimica Clinica (the official journal of SIBioC) prepared this translation. The EFLM has not endorsed nor approved the contents of this translation. The official version of the Document is located at [www.EFLM.eu](http://www.EFLM.eu). Users should cite the original source when citing the document.*

*Il documento originale è disponibile on line (1S) sul sito di Biochimica Clinica.*

Ricevuto: 01.02.2021

Accettato: 23.02.2021

Publicato on-line: 06.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.014

## ABSTRACT

### **A proposed common training framework for specialists in laboratory medicine under EU directive 2013/55/EC (The recognition of professional qualifications).**

European Union (EU) Directive 2013/55/EC (The Recognition of Professional qualifications) allows Member States to decide on a common set of minimum knowledge, skills and competences that are needed to pursue a given profession through a Common Training Framework. To be adopted the framework must combine the knowledge, skills and competences of at least one third of the Member States. Professionals who have gained their qualifications under a Common Training Framework will be able to have these recognised automatically within the Union. The backbone of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine's (EFLM) proposed Common Training Framework for non-medical Specialists in Laboratory Medicine is outlined here. It is based on an Equivalence of Standards in education, training, qualifications, knowledge, skills, competences and the professional conduct associated with specialist practice. In proposing the recognition of specialist practice EFLM has identified 15 EU Member States able to meet Equivalence and in whom the profession and/or its training is regulated (an additional EU Commission requirement). The framework supports and contributes to the Directive's enabling goals for increasing professional mobility, safeguarding consumers and ensuring a more equitable distribution of skills and expertise across the Member States. It represents EFLM's position statement and provides a template for professional societies and/or competent authorities to engage with the EU Commission.

## IL CONTESTO

È stimato che fino al 70% di tutte le decisioni in campo medico siano basate su dati e informazioni forniti dalla Medicina di Laboratorio (1,2). È la specialità su cui si basa la comprensione e l'interpretazione dello stato di salute e di malattia nella medicina moderna. La Medicina di Laboratorio comprende numerose discipline, tra le quali chimica clinica/immunologia, ematologia/medicina trasfusionale, microbiologia/virologia/parassitologia, medicina della riproduzione e genetica medica. Offre inoltre strumenti essenziali per lo screening e la diagnosi precoce delle malattie, la diagnosi differenziale, il monitoraggio, la gestione e il trattamento dei pazienti e per la valutazione prognostica. Tale contributo continua a crescere grazie a ricerca e sviluppo, ai progressi tecnologici e all'aumento delle conoscenze e delle competenze degli specialisti.

I circa 30 000 specialisti in Medicina di Laboratorio dell'Unione Europea (EU) si compongono per il 40% di personale con formazione medica, per il 30% con formazione scientifica e per il 30% di personale con formazione in ambito farmaceutico (3). Mentre gli specialisti medici, appartenendo ad una delle sette "professioni regolamentate da direttive settoriali" identificate dalla Direttiva europea 2005/36/EU (4), beneficiano da tempo di un riconoscimento automatico delle loro qualifiche in caso di migrazione professionale in altri Paesi dell'Unione Europea, lo stesso non vale per il 60% del personale con formazione scientifica o farmaceutica che rientra nelle professioni del "sistema generale".

Grazie alla Direttiva Europea 2013/55/EU (Il riconoscimento delle qualifiche professionali) (5), che deriva dalla modifica della Direttiva del 2005, l'Unione Europea:

- fornisce opportunità per il riconoscimento reciproco delle qualifiche per le circa 600 professioni incluse nel

"sistema generale" il che a propria volta,

- aiuta a rendere più rapida ed equa la distribuzione delle risorse umane e dei servizi nel territorio dell'EU,
- agevola chi intende intraprendere una migrazione professionale priva di ostacoli nei confini dell'EU,
- identifica alcuni contributi professionali specifici che possono fungere da "misure compensatorie" nel caso in cui uno Stato membro imponga, per esempio, una riqualificazione, ulteriori qualifiche, test attitudinali o periodi di ambientamento che possono rallentare o costituire un deterrente alla migrazione.

Per proteggere la salute e la sicurezza dei pazienti in caso di trasferimento di un professionista in un nuovo Stato, la Direttiva per le Qualifiche Professionali del 2013 permette agli Stati membri di stabilire un insieme di conoscenze, capacità e competenze minime necessarie per intraprendere una determinata professione tramite un Percorso Comune di Formazione (Common Training Framework, CTF). Per essere adottato, tale piano deve comprendere le conoscenze, capacità e competenze minime stabilite da almeno un terzo degli Stati membri. Le qualifiche ottenute dai professionisti formati seguendo il Percorso Comune di Formazione saranno automaticamente riconosciute senza la necessità di imporre ulteriori "misure compensatorie".

Proporre il riconoscimento dello specialista in Medicina di Laboratorio è in linea con l'obiettivo della European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) nell'assicurare servizi equi, sicuri e di alta qualità per i pazienti appartenenti all'Unione Europea. Nel 1998, l'organizzazione che precedette l'EFLM, la European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EC4), stabilì una "Equivalence of standards" tra gli Stati membri basato su istruzione, formazione, qualificazione, continuo sviluppo professionale e condotta professionale che delinea il ruolo dello Specialista Europeo in Medicina di Laboratorio (European Specialist in Laboratory Medicine, EuSpLM)

(6). Chi è in grado di raggiungere tali standard può iscriversi al registro degli specialisti della EFLM (7). L'Equivalence of Standards, assieme alle conoscenze, le capacità e le competenze previste, costituisce il fondamento per la proposta del Percorso Comune di Formazione qui illustrato. Nel definire i fondamenti del percorso proposto, è stata inizialmente fornita una visione d'insieme del contributo unico degli specialisti e del loro profilo demografico in relazione alle ulteriori disposizioni previste dalla Direttiva per le Qualifiche Professionali del 2013 che interessano, ad esempio, lo stato di regolamentazione e l'adozione di titoli professionali. Il Percorso Comune di Formazione proposto rappresenta la posizione dell'EFLM ed offre agli Stati membri dell'UE un modello da presentare alla Commissione Europea.

## IL CONTRIBUTO DEGLI SPECIALISTI IN MEDICINA DI LABORATORIO PER GARANTIRE IL MIGLIORAMENTO DELLA SALUTE E DELL'ASSISTENZA

### Ruoli e responsabilità

Sebbene l'ambito della pratica consentita a livello specialistico differisca nei Paesi dell'Unione, vi è una sovrapposizione considerevole tale per cui è possibile delineare dei ruoli e delle responsabilità comuni:

- garantire una leadership clinica e scientifica al fine di indirizzare e definire la portata dei servizi forniti dalla Medicina di Laboratorio in modo tale che risultino appropriati per la popolazione locale,
- lavorare affidandosi ad una base di conoscenze estesa e sempre aggiornata per garantire la "best practice",
- capacità di lavorare in un contesto clinico in modo da saper guidare la scelta degli esami diagnostici e l'interpretazione dei loro risultati in caso di screening di popolazione sana o di diagnosi differenziale nel malato, per il trattamento e la valutazione prognostica,
- dirigere e supportare la ricerca e lo sviluppo: innovazione e implementazione di nuove tecnologie; saper avviare, condurre e valutare la ricerca clinica; garantire un' appropriata gestione delle conoscenze,
- essere responsabili della sicurezza dei pazienti attraverso la partecipazione a programmi di controllo di qualità, sottoponendosi a regolari ispezioni e valutazioni che comprendono aspetti etici, legali e di "governance",
- partecipazione a programmi di insegnamento e/o organizzazione degli stessi, istruzione e formazione,
- offrire una leadership clinica che metta al primo posto i bisogni del paziente e contribuisca al miglioramento dei servizi di salute pubblica.

### Il contesto dei contributi degli specialisti

Le conoscenze, la capacità e le competenze a

disposizione dello specialista, lo rendono capace di fornire soluzioni a necessità in continua evoluzione. Tali necessità sono dettate, in parte, dalle priorità definite dai singoli Stati membri; tuttavia sempre più spesso sono emerse tematiche comuni riguardanti la prestazione di servizi sanitari in tutta l'area europea. I continui cambiamenti che richiedono la risposta degli specialisti includono:

- il raggiungimento di una maggiore governance clinica nell'applicazione di esami diagnostici all'interno di protocolli basati sull'evidenza, al fine raggiungere una maggiore appropriatezza diagnostica in ambiti esterni al laboratorio, come nel caso del Point of Care Testing (POCT),
- l'introduzione appropriata di tecnologie in via di sviluppo basate su intelligenza artificiale e soluzioni di tele-medicina che migliorino le riconfigurazioni dei servizi e che permettano un utilizzo più efficiente delle risorse,
- uno spostamento dall'accreditamento volontario a quello obbligatorio, che introduce nuovi requisiti e standard da raggiungere nell'ambito della gestione del laboratorio, la cura del personale, i locali e l'ambiente lavorativo, la tecnologia e i sistemi informatici e il supporto per le fasi pre- e post-analitiche,
- lo spostamento delle priorità di finanziamento verso il miglioramento della salute pubblica con lo scopo di ridurre i ricoveri, richiedendo nuove soluzioni oltre al laboratorio,
- la richiesta che i professionisti e la professione siano propriamente registrati e/o regolamentati per proteggere gli interessi e la sicurezza del pubblico e dei pazienti.

### I DATI DEMOGRAFICI DELLA PROFESSIONE

Grazie ai dati ricevuti da 26 società nazionali che fanno parte di EFLM, si evince che i farmacisti e gli operatori dell'area scientifica costituiscono la maggioranza del personale in 15 Stati membri. Il personale medico costituisce la maggioranza in Austria, Belgio, Bulgaria, Danimarca, Germania, Grecia, Ungheria, Irlanda, Lettonia, Malta e Svezia. I farmacisti rappresentano, invece, la maggioranza in Francia, Spagna e Portogallo mentre gli operatori dell'area scientifica predominano numericamente in Croazia, Cipro, Repubblica Ceca, Estonia, Finlandia, Italia, Lituania, Olanda, Polonia, Romania, Slovenia e Repubblica Slovacca. Secondo quanto riferito, non ci sarebbero specialisti non-medici a Malta e in Austria. Il Lussemburgo non ha fornito informazioni durante la raccolta dei dati demografici.

Gli ambiti di pratica degli specialisti non medici sono illustrati nella Tabella 1. Il ruolo specifico che in molti Stati membri distingue i professionisti non medici dai colleghi medici è l'offerta da parte di questi ultimi di trattamenti sanitari diretti. È stimato che oltre l'80% dei professionisti

**Tabella 1***Ambiti di competenza non-medica in Medicina di Laboratorio negli Stati Europei.*

	Biochemistry	Endocrinology	Immunology	Haematology	Blood transfusion	Microbiology
Austria	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Belgium	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Bulgaria	Yes	Yes	Yes	Partial	No	No
Croatia	Yes	Yes	Yes	Yes	Partial	No
Cyprus	Yes	Yes	Yes	Yes	Partial	Yes
Czech Republic	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Denmark	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Estonia	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Finland	Yes	Yes	Partial	Yes	Partial	Partial
France	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Germany	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Greece	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Hungary	Yes	Yes	Partial	Yes	No	No
Ireland	Yes	Yes	No	No	No	No
Italy	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Latvia	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Lithuania	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Luxembourg						
Malta	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Netherlands	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Poland	Yes	Yes	Yes	Yes	Partial	No
Portugal	Yes	Yes	Yes	Yes	Partial	Yes
Romania	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Slovak Republic	Yes	Yes	Yes	Yes	Partial	Yes
Slovenia	Yes	Yes	Yes	Yes	Partial	Partial
Spain	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Sweden	Yes	Yes	Partial	Yes	Yes	Yes

che lavorano nell'Unione è in grado di raggiungere le competenze polyvalenti in chimica clinica, ematologia e microbiologia (3) dettate dall'Equivalence of Standards dell'EFLM.

La Tabella 2 evidenzia che l'Equivalence of Standards dell'EFLM può essere raggiunto in 19 dei 27 Stati membri dell'Unione. In 15 di questi, la professione o la formazione specialistica è regolamentata a livello governativo, il che è un requisito per proporre un Percorso Comune di Formazione. La tabella evidenzia, inoltre, i titoli professionali che potrebbero beneficiare del riconoscimento automatico grazie alla Direttiva per il Riconoscimento Professionale, una volta adottato un Percorso Comune di Formazione. La diversità dei titoli professionali riflette il fatto che la professione è identificata e/o regolamentata a livello dei singoli Stati membri più che a livello europeo, seppure vengano adottati quadri di qualifica sovrapponibili che soddisfano inoltre i requisiti del "Piano Europeo delle Qualifiche". Al fine di garantire un approccio unificato nel proporre un Percorso comune di formazione, le società affiliate all'EFLM hanno adottato nel 2012 il termine "Specialista in Medicina di Laboratorio" come descrittore unificante della pratica specialistica per tutto il personale medico, scientifico e farmaceutico (8). Sebbene tale termine non sia inteso come denominazione per identificare una

nuova professione oggetto di regolamentazione a livello europeo, il nome costituisce il descrittore centrale all'interno del Percorso Comune di Formazione.

## IL MODELLO DI PERCORSO COMUNE DI FORMAZIONE

### L'Equivalence of Standards of Practice nei Paesi membri dell'UE

L'Equivalence of Standards dell'EFLM permette la distinzione tra lo specialista in Medicina di Laboratorio e il non specialista. Gli elementi chiave per garantire tale distinzione sono stati stabiliti nel processo di Bologna del 1999 (9) e prevedono che:

- il periodo di formazione sia pari a 9 anni (preferibilmente 10) ed includa la Laurea Magistrale ("Master of Science" o titolo equivalente) dopo un periodo iniziale di formazione accademica pari a 4-5 anni, seguita da 4 anni di formazione professionale specialistica approvata dall'EFLM tramite l'espletamento di un esame finale,
- le aspettative del piano di formazione per quanto concerne l'istruzione e la formazione seguano il programma dell'EFLM (10), il quale identifica anche le competenze richieste per garantire una gestione del paziente sicura e di alta qualità,

**Tabella 2**

*Il profilo professionale degli specialisti non-medici in Medicina di Laboratorio. Gli Stati membri in grado di soddisfare i requisiti del Percorso Comune di Formazione di EFLM sono evidenziati in grigio (Belgio, Bulgaria, Croatia, Cipro, czech repulic, Finland, France, Hungary, italy, Lituania, Poland, Portugal, Slovak, Slovenia, Spain).*

	Predominant non-medical specialist practitioner	Meets EFLM equivalence of standards	Professional regulation and/or regulated training in place	Professional title
Austria	Not applicable			
Belgium	Pharmacist	Yes	Yes	Pharmacien biologiste (Pharmacist biologist)
Bulgaria	Scientist	Yes	Yes	Специалист по клинична химия (Specialist in clinical chemistry)
Croatia	Scientist	Yes	Yes	Specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine (Specialist in medical biochemistry and laboratory medicine)
Cyprus	Scientist	Yes	Yes	ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ (DIEFTHINTIS KLINIKOU ERGASTIRIOU) (Clinical Laboratory Director)
Czech Republic	Scientist	Yes	Yes	Bioanalytik pro klinickou biochemii (Bioanalyst for Clinical Chemistry)
Denmark	Scientist	Yes	No	Biokemiker (Biochemist)
Estonia	Scientist	No	No	Laborispetsialist (Laboratory specialist)
Finland	Scientist	Yes	Yes	Sairaalakemisti (Clinical biochemist)
France	Pharmacist	Yes	Yes	Pharmacien biologiste (Pharmacist biologist)
Germany	Scientist	Yes	No	Fachwissenschaftler Labordiagnostik (Biomedical scientist)
Greece	Scientist	Yes	No	Κλινικός Χημικός/Κλινικός Βιοχημικός (Clinical chemist/ clinical biochemist)
Hungary	Scientist	Yes	Yes	Klinikai biokémikus (Clinical biochemist)
Ireland	Scientist	Yes	No	Clinical biochemist
Italy	Scientist	Yes	Yes	Specialista in Patologia clinica e Biochimica clinica (Specialist in Clinical Pathology and Clinical Biochemistry)
Latvia	Scientist	No	Yes	Laboratorijas specialisti (Laboratory Specialist)
Lithuania	Scientist	Yes	Yes	Medicinos biologas (Medical biologist)
Luxembourg	Pharmacist			
Malta	Not applicable			
Netherlands	Scientist	Yes	No	Specialist klinische chemie (Specialist in clinical chemistry)
Poland	Scientist	Yes	Yes	Specialist in Laboratory Diagnostics
Portugal	Pharmacist	Yes	Yes	Especialista em Analises Clinicas (Clinical Analysis Specialist)
Romania	Scientist	Yes	No	Biochemist, Biolog sau Chimist in sistemul sanitar (Biochemist, Biologist or Chemist in the health system)
Slovak Republic	Scientist	Yes	Yes	Laboratórny Diagnostik Specialista (Specialist in Laboratory Diagnostics)
Slovenia	Scientist	Yes	Yes	Specialist medicinske biokemije (Specialist in Medical Biochemistry)
Spain	Pharmacist	Yes	Yes	Especialista (Specialist) Médico, Farmacéutico, Químico o Biólogo (Medical, Pharmaceutical, Chemist or Biologist)
Sweden	Scientist	No	No	Sjuknuskemist (Clinical biochemist)

- gli specialisti siano inclusi in un registro professionale (se disponibile) nel loro paese d'origine e siano tenuti a seguire attività di aggiornamento professionale continuo per mantenere le proprie conoscenze e competenze.

In funzione delle esigenze dei paesi regolamentati, il percorso prevede un contenuto formativo che includa:

- almeno il 35% di chimica generale,
- almeno il 65% di chimica generale e ematologia,
- flessibilità per il rimanente 35% che comprende chimica generale, ematologia, microbiologia, genetica e fecondazione *in vitro* con una proporzione conforme ai requisiti del paese di destinazione e può essere composto da esperienze lavorative, corsi accreditati, esami pertinenti ai programmi di formazione nazionale, tirocini.

Il programma di formazione comprende i principali settori del laboratorio ed include:

- chimica generale: biochimica generale e fisiopatologia, endocrinologia, oncologia, biomarcatori cardiovascolari, metabolici e renali, immunologia, tossicologia e monitoraggio del dosaggio terapeutico dei farmaci,
- ematologia: citometria, emostasi, immunologia cellulare e medicina trasfusionale,
- microbiologia: batteriologia, micologia, virologia, parassitologia e infezioni emergenti di interesse pubblico.

In aggiunta, altri campi di interesse subspecialistico includono:

- genetica: diagnostica molecolare
- *in Vitro* Fertilization (IVF): test per la valutazione

della fertilità, indagini sul liquido seminale, preparazione del liquido seminale (fresco e congelato) e tecniche di fecondazione *in vitro*.

### Conoscenze, capacità e competenze richieste

Attraverso la formazione e la pratica, l'obiettivo è quello di sviluppare le conoscenze, le competenze ed i comportamenti propri dello specialista a livello clinico, scientifico e della pratica professionale. Gli elementi chiave del programma EFLM 2018 sono:

conoscenze generali, capacità e competenze:

- requisiti di conoscenza di base,
- Indicazioni per le applicazioni in Medicina di Laboratorio,
- importanza della raccolta e conservazione dei campioni,
- principi e tecniche analitiche,
- metodi di riferimento,
- valutazione ed accertamento,
- valutazione clinica degli esami di laboratorio caso-specifici,
- training clinico

La conoscenza dello specialista deve includere:

- chimica generale,
- ematologia,
- microbiologia,
- genetica, genomica e citogenetica,
- fecondazione *in vitro* (IVF)

Capacità e competenze richieste per portare avanti ricerca, sviluppo e audit.

Capacità di leadership e competenza:

- direzione del laboratorio e leadership,
- organizzazione e gestione del laboratorio,
- assicurazione di qualità,
- sviluppo professionale continuo tramite formazione e pratica,
- sicurezza in ambiente lavorativo e gestione dei rifiuti,
- considerazioni legali, etiche e di governance,
- pratica professionale e competenze trasversali,

### Il Codice di Condotta (11)

Secondo il codice di condotta, è doveroso per lo specialista comportarsi in modo tale da non compromettere la disciplina e la professionalità proprie della Medicina di Laboratorio e della Chimica Clinica.

Gli specialisti devono valorizzare l'integrità, l'imparzialità ed il rispetto per le persone e adoperarsi per assicurare i più alti standard di qualità ed etica nel proprio lavoro. Inoltre, devono condurre ricerche caratterizzate dai più alti standard di integrità scientifica al fine di garantire la validità dei loro risultati. Tenendo in considerazione gli obblighi previsti dalla legge, devono assicurare gli interessi e la migliore assistenza ai pazienti e a coloro che ricevono la prestazione, considerandoli fondamentali in ogni momento, nonché garantire che gli interessi dei partecipanti alla ricerca siano salvaguardati. Tutti i

professionisti registrati accettano di rispettare il Codice di Condotta, oltre ad essere tenuti a rispettare il Codice di Condotta proprio delle società e degli organi di registrazione nazionali. Nel caso in cui lo specialista dovesse essere soggetto a sanzioni disciplinari (ad esempio sospensione, radiazione dall'albo professionale), l'EFLM applica la medesima sanzione nel Registro EFLM.

### DISCUSSIONE

In accordo con le tre condizioni chiave dettate nella Direttiva per le Qualifiche Professionali che devono essere soddisfatte per poter essere inclusi nel Percorso comune di formazione, gli specialisti non medici:

- possono essere riconosciuti come professione regolamentata e/o una professione la cui formazione è regolamentata in almeno un terzo dei Paesi EU,
- non sono soggetti a riconoscimento automatico come professione settoriale e/o di altro livello nel Percorso comune di formazione,
- possono beneficiare di maggiore mobilità professionale con l'adozione del Percorso comune di formazione.

Il Percorso Comune di Formazione realizzato a guida europea (12) ha presentato un approccio 'bottom up' attraverso il quale le organizzazioni professionali o le autorità competenti di almeno un terzo dei Paesi membri hanno potuto inviare proposte alla Commissione Europea. Tale approccio consente di fornire risposte ai bisogni reali della professione, considerata la conoscenza approfondita e l'attenta comprensione delle tematiche oggetto di regolamentazione. Al momento della stesura, 19 delle Società nazionali affiliate all'EFLM in Europa si dichiarano in grado di soddisfare, nel loro Paese, l'Equivalence of Standards, i livelli di conoscenza, le capacità e competenze attesi ed il Codice di Condotta. Inoltre, tra i 19 Paesi Membri, 15 sono in grado di soddisfare i requisiti proposti dal Percorso Comune di Formazione in quella professione e/o la formazione è regolamentata ed i loro piani di qualifica nazionale sono formalmente associati al Piano di Qualifica Europea per garantire una formazione continua (13), un ulteriore requisito richiesto dalla Commissione Europea per poter inviare proposte relative al percorso comune.

La Commissione Europea ha l'opportunità di adottare un Percorso Comune di Formazione tramite atti delegati (un atto delegato può essere introdotto all'interno del testo di una normativa europea, come nel caso della Direttiva per il riconoscimento delle Qualifiche Professionali che permette di includere atti delegati proposti da rappresentanti appartenenti alla Commissione) seguiti da atti di esecuzione all'interno dei quali sono elencate le qualifiche professionali ed i titoli nazionali che beneficiano di riconoscimento

automatico all'interno del Percorso di Formazione Professionale adottato (14). Mentre la Medicina di Laboratorio ha stabilito elementi chiave per il mutuo riconoscimento delle qualifiche dei suoi specialisti, una sfida prioritaria in tutta l'UE consiste nel determinare la "proporzionalità" dei quadri di regolamentazione professionale realizzati e/o modificati nel corso degli anni attuati nei singoli Paesi membri (15).

La disomogenea regolamentazione delle professioni nell'Unione Europea ha avuto un impatto negativo sulla prestazione dei servizi e sulla mobilità dei professionisti nell'ottica del mercato unico europeo; da qui è sorta la necessità di una valutazione dell'esercizio comune basata sulla trasparenza ed il fondamento promossa dalla Commissione tramite l'emanazione della Direttiva Europea 2013/55/EC all'interno della quale gli Stati membri forniscono una lista delle professioni regolamentate, le attività loro riservate ed il fondamento alla base della necessità di regolamentazione (16). La successiva Direttiva sulla Proporzionalità del 2018 (17) ha integrato la Direttiva del 2013 e ha richiesto agli Stati membri di revisionare le regolamentazioni preesistenti o di programmare una nuova stesura.

## CONCLUSIONI

Attraverso il coinvolgimento delle organizzazioni professionali, 15 Stati membri dell'UE sono stati identificati come candidati firmatari del Percorso Comune di Formazione per Specialisti in Medicina di Laboratorio. Ottenere il riconoscimento della qualifica professionale è un progetto in corso, in parte dettato da scadenze e giurisdizioni esterne, ma voluto fortemente anche dalle autorità competenti e dalle organizzazioni professionali che riconoscono gli effetti catalizzatori che la Direttiva per le Qualifiche Professionali svolge nel garantire l'armonizzazione della formazione e della pratica al fine di salvaguardare la sicurezza del paziente quando il professionista si muove da un Paese all'altro attraverso i confini dell'Unione Europea. Il Percorso Comune di Formazione non sostituisce i programmi nazionali di formazione post-laurea, a meno che i Paesi membri non decidano altrimenti (5). È da sottolineare come il programma EFLM sia stato adottato come modello di formazione e istruzione in 19 Stati membri. In attesa di ulteriori progressi determinati dall'attuazione della regolamentazione professionale proporzionale e di ulteriori indicazioni fornite da parte dell'Unione Europea, l'onere spetta alle società nazionali e alle autorità competenti e da qui sorge la necessità di sfruttare l'opportunità di inviare proposte relative al Percorso Comune di Formazione quando questa si presenti. Il percorso proposto dall'EFLM è sostenuto da più di un terzo delle organizzazioni professionali degli Stati membri in Europa. Il Percorso Comune di Formazione, d'altro canto, mira a consentire il raggiungimento di obiettivi quali la maggiore mobilità professionale e la tutela della sicurezza del paziente e

a garantire una distribuzione più equa delle conoscenze e delle competenze in tutti i Paesi membri.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Report of the review of NHS pathology services in England. <https://www.networks.nhs.uk/nhs-networks/peninsula-pathologynetwork/documents/CarterReviewPathologyReport.pdf>.
2. Hallworth MJ. The '70%claim': what is the evidence base?. *Ann ClinBiochem* 2011;48:487–90.
3. Oosterhuis WP, Zerah S. Laboratory medicine in the European union. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:5–14.
4. Directive 2005/36/EC of the European parliament and of the council of 7 september 2005 on the recognition of professional qualifications <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32005L0036>.
5. Directive 2013/55/EU of the European parliament and of the council of 20 november 2013 amending directive 2005/36/EC on the recognition of professional qualifications and regulation (EU) No 1024/2012 on administrative cooperation through the internal market information system ('the IMI regulation') text with EEA relevance <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32013L0055>.
6. Jansen RTP. The EC4 Register of European clinical chemists and EC4 activities. *Clin Chim Acta* 2002;319:143–8.
7. Wieringa GE, Jassam N, Homsak E, Rako I, Racek J. The academy of the European federation of clinical chemistry and laboratory medicine and the European register of specialists in laboratory medicine: guide to the academy and the register, version 4 – 2020. *Clin Chem Lab Med* 2020. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1507>.
8. Zerah S, McMurray J, Horvath AR. Our profession now has a European name: specialist in laboratory medicine. *Biochem Med* 2012;22:272–3.
9. The Bologna process and the European higher education area. [https://ec.europa.eu/education/policies/higher-education/bologna-process-and-european-higher-education-area\\_en](https://ec.europa.eu/education/policies/higher-education/bologna-process-and-european-higher-education-area_en). Wieringa et al.: Common training framework for specialists in laboratory medicine 7
10. JassamN, Lake J, DabrowskaM, Queraltto J, Rizos D, Lichtinghagen R, et al. The European federation of clinical chemistry and laboratory medicine syllabus for postgraduate education and training for specialists in laboratory medicine: version 5 – 2018. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1846–63.
11. McMurray J, Zerah S, HallworthM, Koeller U, Blaton V, Tzatchev K, et al. The European register of specialists in clinical chemistry and laboratory medicine: code of conduct, version 2 – 2008. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:372–5.
12. European Commission. Common Training Frameworks – expressions of interest and way forward. European Commission Grow 2015. D4/SW/pt Ares(2015) S 275275, 21st January.

13. The European qualifications framework <https://www.cedefop.europa.eu/en/events-and-projects/projects/europeanqualifications-framework-efq>.
14. European Commission. Implementing and delegated acts [https://ec.europa.eu/info/law/law-making-process/adopting-eu-law/implementing-and-delegated-acts\\_en#implementing-acts](https://ec.europa.eu/info/law/law-making-process/adopting-eu-law/implementing-and-delegated-acts_en#implementing-acts).
15. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on a proportionality test before adoption of new regulation of professions. [https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/BG/ALL/?uri=CELEX:52016PC0822R\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/BG/ALL/?uri=CELEX:52016PC0822R(01)).
16. European Commission Press release. Commissioner Michel Barnier welcomes the trilogue agreement on the modernisation of the professional qualifications directive. Memo [serial on the Internet]; 2013. Available from: [http://europa.eu/rapid/pressrelease\\_MEMO-13-552\\_en.htm#st=0](http://europa.eu/rapid/pressrelease_MEMO-13-552_en.htm#st=0).
17. Directive (EU) 2018/958 of the European Parliament and of the Council of 28 June 2018 on a proportionality test before adoption of new regulation of professions. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2018/958/oj>.

riservato ai lettori di Biochimica Clinica

**Buono  
sconto**

**20%**  
sul prezzo di copertina!

€ 20,00

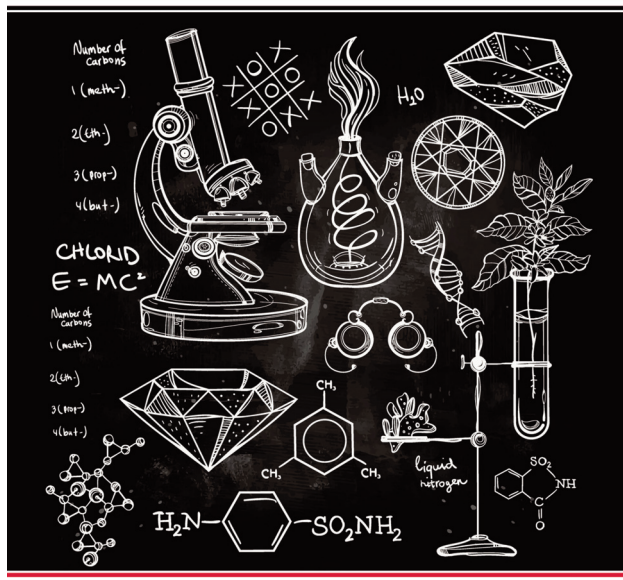
~~€ 25,00~~

Medicina di Laboratorio  
**LABIO**

**BC**  
biochimica clinica

**CASI CLINICI  
IN MEDICINA  
DI LABORATORIO**


A cura di  
MARIA STELLA GRAZIANI e MAURO PANTEGHINI



€ 40,00

~~€ 50,00~~

**BB**  
Biomedica Source Books




**20**

**Quiz, Quesiti e Casi clinici  
di Medicina di Laboratorio**

A cura di  
Piero Bonvicini (1945-2005),  
Michele Bellenzier, Antonio Croce, Arianna De Pellegrin,  
Bruno Forcina, Nunzio Toffano, Carlo Zambon

Presentazione di  
Mario Plebani

 BIOMEDIA  
La tradizione del sapere

**NOVA  
RISTAMPA**

**...e molto altro ancora**

per maggiori informazioni:  
[ordini@biomedia-net](mailto:ordini@biomedia-net)



# CORSI FAD ECM SIBioC 2021

## AGGIORNAMENTI SULLE VARIABILI PREANALITICHE IN MEDICINA DI LABORATORIO

*Graziella Bonetti, Davide Giavarina*

**15 crediti ECM**

---

## I DOAC: DALLA FARMACOLOGIA, ALLE INDICAZIONI CLINICHE, AL MANAGEMENT CLINICO

*Benedetto Morelli, Barbara Montaruli*

**21 crediti ECM**

---

## AGGIORNAMENTI SULLA DIAGNOSTICA DELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI

*Patrizia Natali, Giovanni Cigliana*

**15 crediti ECM**

---

## VARIABILITÀ BIOLOGICA

*Anna Carobene*

**15 crediti ECM**

***Altri corsi FAD ECM provider SIBioC  
sono in fase di realizzazione***

Per info: [www.sibioc.it](http://www.sibioc.it)

# Sistemi da sangue intero capillare per il Point of Care Testing Soluzioni per la medicina territoriale in connettività



**NOVA**  
biomedical®

Contattaci per maggiori informazioni:  
novabiomedical.com/it  
Tel: +39 02 87071482  
Email: it-info@novabio.com





# BIO MEDIA

La condivisione del sapere

“ Da oltre vent'anni al servizio della comunità scientifica ”



**Provider ECM  
residenziale e FAD**



**Servizi di Segreteria  
Società Scientifiche**



**Casa Editrice**



**Servizi web e strategie  
di comunicazione**



**Family Health  
Fascicolo Sanitario Digitale Personale**

Biomedica progetta, organizza e coordina eventi formativi ECM medico-scientifici residenziali e a distanza. È partner di numerose Società Scientifiche, editore in ambito sanitario, ed è attiva nell'ambito della comunicazione digitale, realizzando servizi sviluppati e gestiti *in house*.