

## Young Scientists: il motore della Medicina di Laboratorio

Andrea Bartolini<sup>1</sup>, Daria Debbia<sup>2</sup>, Ilenia Aversa<sup>3</sup>, Ilaria Baudone<sup>4</sup>, Laura Bergantini<sup>5</sup>, Margherita Borriello<sup>6</sup>, Alessia Cafaro<sup>7</sup>, Chiara Della Franca<sup>8</sup>, Alice Nevone<sup>9</sup>, Eleonora Sabetta<sup>10</sup>, Margherita Scapaticci<sup>1</sup>, Rossella Tomaiuolo<sup>11,12</sup>, Tommaso Trenti<sup>2</sup>, Giulia Sancesario<sup>13</sup>

<sup>1</sup>LUM – Laboratorio Unico Metropolitan, AUSL Bologna, Bologna

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina e Patologia di Laboratorio, AUSL/AOU Modena, Modena

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Cattedra di Biochimica Clinica, Università “Magna Graecia”, Catanzaro

<sup>4</sup>S.S.D Tossicologia, Laboratorio analisi, Ospedale San Bartolomeo, ASL5, Sarzana (SP)

<sup>5</sup>Dipartimento Scienze mediche, chirurgiche e neuroscienze, Università di Siena, Siena

<sup>6</sup>Dipartimento di Medicina di Precisione, Università degli Studi della Campania “Luigi Vanvitelli”, via L. De Crecchio 7, Napoli

<sup>7</sup>IRCCS Istituto Giannina Gaslini, U.O.C. Laboratorio Centrale di Analisi Settore Cromatografia e Spettrometria di Massa, Genova

<sup>8</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari (DISB), Sezione di Biochimica e Biotecnologie, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Urbino

<sup>9</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Centro di Ricerca e Cura dell’Amiloidosi, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

<sup>10</sup>IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

<sup>11</sup>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

<sup>12</sup>IRCCS Galeazzi-Sant’Ambrogio, Milano

<sup>13</sup>Unità di Neurochimica Clinica e Biobanca, Fondazione IRCCS Santa Lucia, Roma

### ABSTRACT

#### Young Scientists: the engine of Laboratory Medicine.

The acquisition of solid skills for planning of careers has always represented a challenge for a Young Scientist (YS). The current desire for a restart after the recent pandemic, places even more attention on these issues, offering young specialists in Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine the possibility of being the driving force behind this restart. To do this, it is essential to invest in own skills, develop an accurate strategy, be a change maker and, sometimes, think outside the box. This paper collects some important themes discussed during the conference “Young Scientists: the engine of Laboratory Medicine” organized by the SIBioC YS Study Group, which took place in Modena (Italy) in December 2023.

**Parole chiave:** young scientists, innovazione, medicina di laboratorio

### INTRODUZIONE

L’acquisizione di solide competenze per la pianificazione della propria carriera rappresenta da sempre una sfida per un giovane ai primi passi nella professione (Young Scientist, YS). L’attuale desiderio di ripartenza dopo la recente pandemia pone ancora di più l’attenzione su queste tematiche offrendo ai giovani specialisti di Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio (MdL) la possibilità di essere il “motore” di tale ripartenza. Per fare ciò, è fondamentale investire sulle proprie competenze, elaborare un’accurata strategia, essere

promotore del cambiamento e, talvolta, pensare fuori dagli schemi. Gli YS dovrebbero essere in grado di cogliere queste sfide acquisendo competenze chiave e abilità specifiche, in una situazione generale molto eterogenea e resa ancora più complessa e competitiva dalle profonde differenze di valori e opportunità che caratterizzano le realtà nazionali.

In questo collective paper sono raccolti alcuni importanti temi discussi nel corso del convegno “Young Scientists: il motore della Medicina di Laboratorio” organizzato dal Gruppo di Studio SIBioC YS, che si è svolto a Modena il 7 dicembre 2023. In particolare,

Corrispondenza a: Andrea Bartolini, LUM – Laboratorio Unico Metropolitan, AUSL Bologna, Ospedale Maggiore Carlo Alberto Pizzardi, largo Bartolo Nigrisoli 2, 40133, Bologna, e-mail: andrea.bartolini@ausl.bologna.it

Ricevuto: 17.09.2024

Rivisto: 29.09.2024

Accettato: 06.10.2024

Published on-line: 15.11.2024

DOI: 10.19186/BC\_2024.063

sono affrontati alcuni aspetti dell'attuale processo di innovazione in cui lo specialista di Medicina di Laboratorio è motore, come lo sviluppo di nuove tecnologie per i Point of Care Testing (PoCT), l'integrazione tra ricerca clinica e attività di laboratorio nella farmacotossicologia, nella diagnostica pediatrica, nelle neuroscienze e nell'immunologia delle malattie infettive, infiammatorie e tumorali.

### IL MOTORE DELLA MEDICINA DI LABORATORIO E "L'UOMO A MOTORE"

Il progresso tecnologico e la transizione digitale hanno innescato una straordinaria trasformazione dei laboratori di patologia clinica e, di conseguenza, della figura del professionista di laboratorio. Le moderne piattaforme tecnologiche condivise permettono di gestire in modo integrato le attività ed ottimizzare le risorse utilizzando al meglio le economie di scala derivanti dall'automazione per fornire risposte in tempi più rapidi e ad un costo inferiore. Tuttavia, questa trasformazione presenta l'alto rischio di generare un impatto negativo sul professionista di laboratorio, creando un senso di alienazione dovuto al cambiamento e ad una eccessiva ripetitività delle azioni.

Nel 1913 un'intuizione rivoluzionaria di Henry Ford diede un impulso decisivo allo sviluppo dell'industria e portò alla realizzazione della prima catena di montaggio della storia con l'introduzione del nastro trasportatore con il quale gli operai, avendo ognuno un compito prestabilito secondo la miglior sequenza logica di realizzazione, riuscivano ad ultimare il prodotto nella maniera più rapida possibile. Se da una parte, dunque, l'automazione presenta l'enorme vantaggio di abbattere i tempi ed i costi di produzione, dall'altra rischia di avere un impatto negativo sull'operatore, spogliandolo delle proprie intuizioni e del suo spirito di iniziativa. I moderni laboratori vedono nell'automazione totale la sfida per il raggiungimento della massima efficienza e produttività, per questo motivo è necessario porre l'attenzione sul ruolo dello specialista, al fine di sfruttare al meglio le opportunità date dal progresso scientifico e tecnologico. Infatti, l'introduzione di queste tecnologie può rappresentare un mezzo per raggiungere obiettivi concreti e a tale scopo risulta essenziale adottare un approccio strategico, basato su un'analisi preliminare accurata, che tenga conto delle risorse, dei tempi e dei ruoli coinvolti, per garantire che le innovazioni siano sfruttate al massimo del loro potenziale e portino un reale beneficio ai pazienti.

Nel processo di trasformazione dei laboratori il cardine centrale è l'evoluzione della professione, ovvero lo spostamento dalla semplice produzione di dati alla produzione di "valore": il professionista deve diventare il *"gestore dell'informazione clinica, catalizzatore di conoscenza, team leader, guardiano della qualità ed amministratore di beni pubblici, supporto esperto al paziente"* (1). In questo scenario, i giovani professionisti possono essere i protagonisti (il motore) che alimenta questo cambiamento, grazie alla propensione all'innovazione, alla cooperazione in gruppi di lavoro multicentrici o transnazionali (2,3), alla

formazione di reti che favoriscano la crescita e stimolino l'internazionalizzazione. Inoltre, gli YS possono sfruttare nella loro professione l'enorme opportunità offerta dal mondo digitale e dai nuovi mezzi di comunicazione sociali (4,5) pur riconoscendo i potenziali rischi e le minacce sulla sicurezza e la privacy. All'interno della MdL, gli YS devono quindi essere in grado di cogliere le opportunità date dal cambiamento, essere il "motore" di questa trasformazione, e non "uomini a motore" destinati ad un inarrestabile declino causato dalla completa automazione dei processi, come descritto dai versi del poeta Gianni Rodari: *"...Correvano tutto il giorno/senza mai fermarsi:/non avevano neanche/il tempo di salutarsi./E non scambiando mai/né parole né saluti/pian piano i poveretti/diventarono muti..."* (6).

Nell'Agenda 2030 dell'ONU per lo Sviluppo Sostenibile (7), viene tracciato un programma d'azione per le persone, il pianeta e la prosperità, in cui la sostenibilità non riguarda solamente l'ambiente e le strategie sostenibili, ma più in generale il miglioramento della vita delle persone, sia sul luogo di lavoro sia nel loro privato, e orienta verso l'implementazione di politiche finalizzate a migliorare il benessere e l'equilibrio tra lavoro e vita privata. L'introduzione di nuove tecnologie in ambito sanitario deve dunque essere considerata come un vero e proprio progetto di cambiamento. Questo richiede una pianificazione dettagliata che includa un'analisi preliminare delle azioni necessarie, delle risorse disponibili, dei tempi di implementazione e dei ruoli coinvolti. Per essere protagonisti del cambiamento, i giovani professionisti devono prestare attenzione alla propria crescita professionale misurando il proprio livello di soddisfazione, per esempio attraverso questionari di auto-somministrazione (Figura 1), per attuare strategie nuove che possano stimolare il miglioramento ed il raggiungimento di nuovi obiettivi.

### LE TECNOLOGIE DEL LABORATORIO DEL FUTURO

#### Progettazione di nuovi PoCT biosensor-based per la quantificazione di marcatori dell'infiammazione

I PoCT rappresentano una modalità organizzativa vantaggiosa per la possibilità di ridurre i tempi di esecuzione degli esami che possono essere eseguiti in prossimità del paziente (8, 9). L'infiammazione è alla base di numerosi processi patologici, pertanto la possibilità di quantificarne in modo accurato i biomarcatori attraverso sistemi PoCT è di grande interesse (10). A tal fine, nell'ambito dell'attività dell'Università "Federico II", sono stati sviluppati due tipi di tecnologie:

- Screen Printed Electrode (SPE), dispositivi elettrochimici il cui funzionamento si basa su variazioni di parametri elettrici dipendenti dalla presenza del biomarcatore. Per rendere il dispositivo più sensibile ed ecologico, il working electrode (WE) dello SPE è stato ricoperto con TEGO (Thermally Exfoliated Graphene Oxide).

- Lateral Flow Assay (LFA), dispositivi di tipo ottico, di semplice uso e di basso costo ampiamente utilizzati

1. Progetto di Ricerca Attuale: sei soddisfatto delle attuali tematiche di ricerca a cui stai partecipando?	(1) Molto soddisfatto – (2) Soddisfatto – (3) Neutro – (4) Insoddisfatto – (5) Molto insoddisfatto
2. Collaborazione e Networking: come valuti le opportunità di collaborazione e networking nella tua attuale istituzione o all'esterno?	(1) Molto positive – (2) Positive – (3) Neutre – (4) Negative – (5) Molto negative
3. Risorse e Strumenti: ritieni di avere accesso sufficiente a risorse e strumenti per condurre la tua ricerca in modo efficace?	(1) Sì, in modo adeguato – (2) In parte – (3) Neutro – (4) No, in modo insufficiente – (5) Assolutamente no
4. Supporto da Parte della Direzione: senti di ricevere un adeguato supporto e riconoscimento dalla direzione dell'istituzione?	(1) Sì, molto – (2) Sì – (3) Neutro – (4) No – (5) Assolutamente no
5. Sviluppo di Competenze: hai avuto opportunità di sviluppare nuove competenze o approfondire quelle esistenti durante il tuo lavoro?	(1) Molto spesso – (2) Spesso – (3) A volte – (4) Raramente – (5) Mai
6. Bilanciamento tra Sfide e Realizzazioni: come valuti il bilanciamento tra le sfide professionali e le realizzazioni nella tua attività di ricerca?	(1) Equilibrato – (2) Predominantemente positivo – (3) Neutro – (4) Predominantemente negativo – (5) Sfavorevole
7. Prospettive di Carriera: senti che ci siano opportunità di crescita e avanzamento di carriera nella tua attuale posizione?	(1) Molto confidente - (2) Confidente – (3) Neutro – (4) Meno confidente – (5). Poco confidente
8. Supporto per la Vita Personale: come valuti il supporto offerto per bilanciare la tua vita professionale e personale?	(1) Molto buono – (2) Buono – (3) Neutro - (4) Scarso – (5) Molto scarso

**Figura 1**

*Questionario sulla Soddisfazione Professionale del Ricercatore Scientifico.*

*Il questionario è stato creato con il supporto dell'Intelligenza Artificiale. Le scale di interpretazione sono state definite dagli autori.*

durante la pandemia da SARS-CoV-2 (11). Il rilevatore degli LFA brevettato in questa esperienza si basa sulla presenza di nanoparticelle d'oro (AuNPs) la cui funzionalizzazione è avvenuta mediante Photochemical Immobilization Technique (brevetto n° 202018000003368) (12) che rende il dispositivo altamente sensibile.

Gli SPE/TEGO sono stati messi a punto per la determinazione semiquantitativa di TNF $\alpha$ . Il PoCT è stato valutato utilizzando 50  $\mu$ l di siero a concentrazioni note e crescenti di TNF $\alpha$  misurate con spettroscopia di impedenza (EIS). Questo approccio si candida ad essere quello più adatto per la calibrazione dei dispositivi e la standardizzazione del protocollo di misurazione: i risultati ottenuti dalla elaborazione di due sessioni di misura ha consentito di rilevare una tendenza nella quantificazione di TNF $\alpha$  che consente di ridurre gli effetti legati alla variabilità della misura della linea di base, problematica già nota in letteratura per questo tipo di piattaforma tecnologica. I risultati ottenuti, seppur con la necessità di ulteriori esperimenti, indicano che gli SPE rispondono a concentrazioni di TNF $\alpha$  comprese tra 1 e 10 pg/mL.

Gli LFA, progettati per misurare Interleuchina 6 (IL-6),

sono stati valutati su siero di 35 pazienti con long-COVID. L'analisi comparativa è stata effettuata confrontando le misurazioni ottenute con gli LFA con quelle ottenute su una piattaforma multiplex ELISA (ELLA™). La correlazione lineare tra i due metodi si è rivelata soddisfacente. Il confronto con la metodica ELISA ha permesso di calcolare il limite di rilevabilità (LoD) per IL-6 della tecnologia LFA: 5 pg/mL. I risultati ottenuti, data la particolarità delle molecole testate e del loro potenziale utilizzo in contesti di prossimità al letto del paziente incoraggiano ulteriori studi necessari alla definizione delle prestazioni diagnostiche dei PoCT progettati.

### **Sequenziamento “bone marrow-free” dei geni della proteina M: un approccio di biopsia liquida nelle gammopatie monoclonali**

Le gammopatie monoclonali (GM) sono un eterogeneo gruppo di patologie caratterizzate dalla presenza di un clone di plasmacellule che secernono un anticorpo monoclonale, la componente monoclonale (CM). In alcune forme, complessivamente designate

GM di significato clinico (MGCS), a fronte di un clone cellulare piccolo e scarsamente proliferante, la CM si rende direttamente responsabile di danno d'organo potenzialmente fatale, rappresentando quindi non solo un marcatore tumorale da ricercare a scopo diagnostico o di monitoraggio della risposta alla terapia anti-clonale, ma anche l'agente eziologico del quadro patologico. Queste condizioni rappresentano il banco di prova ideale per l'applicazione dei principi della medicina personalizzata di precisione basati sulla diagnostica di laboratorio.

Le metodiche di laboratorio attualmente validate per il sequenziamento della CM possono essere applicate su campioni di midollo osseo, precludendo dunque questo tipo di indagini ai pazienti molto fragili, non idonei ad una procedura invasiva come l'aspirato midollare. Inoltre, anche i pazienti che hanno una GM di significato incerto (MGUS) non hanno un'indicazione per effettuare lo studio midollare, il quale viene eseguito solo in presenza di alcuni fattori di rischio. Nelle GM, tuttavia, la presenza di cellule tumorali circolanti, da un lato, e la possibilità di analizzare il repertorio anticorpale attraverso approcci di New Generation Sequencing (NGS) e proteomici, dall'altro, possono fornire l'opportunità per sequenziare i geni espressi della CM paziente-specifica nel sangue periferico.

A questo scopo, il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia ha recentemente messo a punto un approccio di biopsia liquida che integra analisi trascrittomiche su cellule circolanti da sangue periferico con analisi proteomiche su matrice urinaria e/o sierica. Questo approccio prevede dapprima di ottenere l'intera sequenza variabile di catene leggere (ed eventualmente pesanti) immunoglobuliniche espresse dalle cellule circolanti con l'impiego della metodica di Single Molecule Real-Time Sequencing of the M protein (SMaRT M-Seq) (13). Successivamente, le sequenze immunoglobuliniche circolanti paziente-specifiche vengono impiegate per mappare i peptidi ottenuti mediante approccio proteomico con spettrometria di massa (MS) su urine ed eventualmente siero, al fine di individuare la sequenza immunoglobulinica clonale.

Uno studio comparativo effettuato su una coorte di 80 pazienti affetti da GM (MGUS, mieloma multiplo e amiloidosi AL), utilizzando il sequenziamento della catena leggera clonale su campioni di sangue midollare, ha dimostrato come il solo sequenziamento immunoglobulinico su sangue periferico sia sufficiente ad individuare una chiara sequenza immunoglobulinica dominante, in tutto omologa alla sequenza clonale identificata nel campione di sangue midollare, nel 66% dei casi analizzati. L'integrazione del sequenziamento immunoglobulinico su sangue periferico con le indagini del proteoma urinario mediante MS ha consentito di identificare la corretta sequenza immunoglobulinica nel 96% dei casi esaminati.

Tali risultati appaiono di grande rilevanza poiché dimostrano la fattibilità di determinare in modo affidabile l'intera sequenza variabile delle catene immunoglobuliniche clonali nella maggior parte dei pazienti con GM in modo min-invasivo, impiegando matrici quali il sangue periferico o le urine, senza necessità di

studiare il midollo osseo. Ciò potrebbe dunque facilitare gli approcci alla medicina personalizzata, compresa la ricerca mediante metodiche ad elevata sensibilità e specificità analitica della CM paziente-specifica per lo studio della malattia minima residua dopo la terapia, nonché l'implementazione di modelli predittivi di intelligenza artificiale basati sulla sequenza per l'identificazione di CM potenzialmente patologiche o recanti fattori di rischio quali la presenza di siti di N-glicosilazione a livello di particolari regioni della catena leggera clonale (14).

### **Medicina di Laboratorio e medicina di precisione: applicazioni della spettrometria di massa alla farmacotossicologia e alla diagnostica pediatrica**

#### *Farmacotossicologia*

Le tecnologie basate sulla spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS) stanno sempre di più assumendo un ruolo fondamentale nella pratica della medicina di precisione. Qui di seguito sono descritte alcune esperienze avvenute nella Regione Liguria riguardanti l'utilizzo pratico di questa particolare metodica.

Per Decreto Ministeriale (15) possono accedere alla cannabis terapeutica i pazienti che soffrono dei sintomi collegati ad alcune patologie (16), ma la posologia e la via di somministrazione dei preparati somministrabili per via orale (oli o decotti) o per via inalatoria risultano alquanto variabili. Ad oggi le due molecole più rilevanti per i loro effetti terapeutici sono il THC tetraidrocannabinolo (THC) e il cannabidiolo (CBD), entrambe presenti all'interno della infiorescenza della *Cannabis sativa* sotto forma di precursori acidi senza effetto psicotropo né terapeutico (17). In base al contenuto di cannabinoidi carbossilati (THC-acido e CBD-acido) e decarbossilati (THC e CBD) presenti nel prodotto finale, i decotti e l'olio di cannabis mostrano differenti proprietà farmacocinetiche e conseguenze cliniche sui soggetti in trattamento; per questo motivo è necessaria la titolazione dei principi attivi per ciascun lotto di prodotto. Nella regione Liguria oltre un migliaio di pazienti risulta in trattamento con cannabis, principalmente con preparazioni galeniche oleose prodotte dalle farmacie ospedaliere del territorio (ASL2, ASL3, ASL4 e IRCCS Gaslini). Per la titolazione, i preparati galenici sono inviati presso due laboratori di riferimento che hanno sviluppato un protocollo per standardizzare la procedura di titolazione (18): il Laboratorio di tossicologia di Sarzana (SP) e il Laboratorio analisi dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini di Genova.

Uno studio retrospettivo ha valutato la variabilità di concentrazione dei principi attivi di quattro preparati galenici (Bedrocan, Pedanios 22/1, Bediol e FM2), prodotti dalle farmacie ospedaliere suddette, per un totale di 225 campioni. Per la preparazione è stata utilizzata la metodica estrattiva Romano Hazekamp (19). La determinazione delle forme decarbossilate e acide dei principi attivi è stata effettuata mediante LC-MS/MS a triplo quadrupolo (20). Per le varietà Bedrocan e

Pedanium 22/1 è stato rilevato un contenuto di THC totale circa del 22% e un contenuto di CBD totale inferiore al 1%. Per le varietà Bediol e FM2, invece, il quantitativo di THC e CBD presente nell'infiorescenza è simile (circa 8%). Supponendo che la totalità dei principi attivi estraibili dall'infiorescenza sia data dalla somma dei principi attivi stessi presenti nella titolazione, è stato calcolato un valore indicativo della resa di decarbossilazione. Le concentrazioni dei quattro principi attivi sono risultate invariate all'interno dei diversi lotti, mentre è stata evidenziata una variabilità a seconda della farmacia di provenienza (ad esempio, una variabilità tra il 31 e il 42% per Pedanium 22/1 e Bedrocan e circa del 40% per Bediol e FM2). Questa differenza rimane costante nella totalità dei campioni, dimostrando la presenza di un errore sistematico ascrivibile alla procedura di estrazione. La mancanza di standardizzazione dei preparati rimane una criticità, rendendo difficile il dosaggio terapeutico e il monitoraggio clinico del paziente, con rischi legati ai possibili effetti collaterali in caso di incrementi posologici. Tali problematiche potrebbero essere superate tramite l'utilizzo di prodotti a base di cannabis a titolo noto commercializzati dall'industria farmaceutica disponibili in concentrazioni già standardizzate di CBD e THC, che faciliterebbero l'allestimento di preparazioni bilanciate e personalizzate per i pazienti.

#### *Monitoraggio terapeutico dei farmaci in pediatria*

La diagnostica farmacologica nei pazienti pediatrici, la cui particolarità è la gestione dei volumi limitati di fluidi biologici disponibili (21) è un altro ambito nel quale la tecnologia LC-MS/MS risulta fondamentale. LC-MS/MS è ad oggi il gold standard per la quantificazione di piccole molecole, ma la disponibilità di kit commerciali certificati IVDR (Regolamento sui Dispositivi Diagnostici in *Vitro*) è ancora limitata, costringendo i laboratori ad un accurato lavoro di sviluppo e validazione dei metodi in uso. Le aree applicative di maggiore interesse in questa tipologia di diagnostica sono il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM) e l'analisi dei biomarcatori nel campo delle malattie rare metaboliche ed emato-oncologiche. In questo scenario il Laboratorio analisi dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini di Genova nel periodo 2019-2023 ha implementato 77 nuove analisi di routine consentendo la misurazione di numerose molecole, ad esempio antibiotici, antifungini, antiepilettici, antivirali, antiaritmici, chemioterapici e immunosoppressori. Per ottenere ciò è fondamentale creare un'organizzazione del personale che permetta l'implementazione e la gestione di queste determinazioni; in particolare nella realtà qui descritta coesistono due gruppi di lavoro, il gruppo R&D (composto da due chimici, un farmacologo e un biologo) e il gruppo di produzione (composto da sei tecnici di laboratorio). Il gruppo R&D si concentra su sviluppo e validazione dei metodi e sulla gestione dei campioni per la ricerca clinica di fase I-II-III. Il gruppo di produzione elabora campioni di routine gestendo tutte le fasi analitiche fino alla produzione del referto. Questa esperienza ha portato in questi anni all'analisi di circa 40 000 campioni mediante metodiche validate secondo le linee guida internazionali,

fornendo così un servizio ad alta efficienza per il clinico/ricercatore richiedente.

#### **Sclerosi laterale amiotrofica: scienze omiche e nuove prospettive di conoscenza**

Nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA), come in altre patologie complesse, l'approccio in chiave multi-omica consente una fenotipizzazione approfondita in grado di consentire interventi sanitari di precisione (22). L'architettura genetica di questa patologia è estremamente complessa con una base costituita da ereditarietà di varianti monogeniche rare, associata nel 47,7% dei casi familiari a mutazioni nei geni *SOD1*, *C9ORF72*, *FUS* e *TARDBP*, mentre per le forme sporadiche appare più difficile delineare la genetica del rischio (23). Come per altre patologie, le ripetizioni brevi in tandem rappresentano un florido campo di indagine, al fine di identificare nuovi geni associati al fenotipo SLA, anche nei casi sporadici. Le espansioni esanucleotidiche nel gene *C9ORF72* (24) e le espansioni di triplette CAG nel gene *ATXN2* sono state identificate come fattori di rischio per l'insorgenza della patologia (23,25).

Un approccio multi-omico è stato utilizzato in uno studio condotto dal Perron Institute for Neurological Science a Perth (Australia), in collaborazione con l'università di Uppsala (Svezia), che si è articolato in due fasi: la prima orientata all'approfondimento dell'architettura genetica di pazienti con SLA sporadica e la seconda parte focalizzata sullo studio delle possibili alterazioni proteiche riscontrate nel liquido cefalo rachidiano (LCR) nei medesimi pazienti, confrontando questi ultimi con un gruppo di controllo. Nel periodo 2013-2018, sono stati arruolati 77 pazienti presso l'ospedale di Tartu in Estonia, 51 affetti da SLA sporadica, classificata secondo i criteri di El Escorial (26), e 26 con diagnosi di altre malattie neurologiche, i quali hanno eseguito un prelievo di LCR. Su 47 campioni è stato eseguito il sequenziamento dell'intero genoma a lettura corta, mentre su 6 il sequenziamento a lettura lunga. Le sequenze sono state successivamente allineate al genoma di riferimento (GRCh38) e analizzate per individuare ripetizioni tandem patogeniche. Lo strumento bioinformatico GangSTR (<https://github.com/gymreklab/GangSTR>) è stato utilizzato per genotipizzare 12 loci di ripetizioni tandem patogenici nel genoma umano (*C9orf72*, *ATXN2*, *ATXN1*, *ATXN7*, *FMR1*, *DM1-AS*, *PPP2R2B*, *ATXN8OS*, *HTT*, *CACNA1A*, *ATXN3* e *TBP*). Inoltre, è stata eseguita l'analisi proteomica del LCR LC-MS/MS ad alta risoluzione su 24 pazienti con SLA sporadica e 26 controlli.

I dati preliminari confermano l'ipotesi che la SLA potrebbe presentare un'eredità poligenica e dimostra come le long-reads siano maggiormente efficaci nel rilevare espansioni più lunghe (ad esempio ripetizioni in tandem in *C9ORF72*). L'eredità poligenica è stata supposta in quanto in un paziente si è evidenziata la copresenza di espansioni di range patogenetico in differenti geni: *HTT*, *CACNA1A* e *ATXN2*. *ATXN2* è stato già riconosciuto come fattore di rischio di SLA (25), mentre resta in dubbio se ci possa essere una sovrapposizione genetica tra *HTT* (gene associato allo sviluppo di Corea

di Huntington) e SLA (27). Le espansioni di ripetizioni CAG in *HTT* potrebbero non essere un fattore di rischio predominante per la SLA, ma potrebbero comunque giocare un ruolo in una minoranza di casi, in quanto sono stati collegati a un piccolo sottogruppo di casi di FTD/SLA (28). Pertanto, la relazione tra le espansioni di ripetizioni CAG in *HTT* e la SLA rimane complessa e merita ulteriori indagini per conciliare queste diverse conclusioni. Per quanto riguarda il gene *CACANA1A*, non è stata riconosciuta una forte correlazione con fenotipo SLA (29) ma data l'implicazione di altri geni dei canali del calcio nella SLA, è plausibile che possa giocare un ruolo nella complessa eziologia della malattia.

Per l'analisi di proteomica, il confronto statistico tra il gruppo di pazienti SLA e il gruppo di controllo ha rilevato cambiamenti significativi nella quantificazione proteica nei due gruppi ( $p < 0,05$ ), soprattutto nei livelli di proteine coinvolte in processi infiammatori, nei processi di neuroprotezione e nei processi di stress del reticolo endoplasmatico. Inoltre, si è osservata una significativa riduzione dei livelli di proteine del complemento da consumo e una diminuzione dei suoi inibitori, come la diminuzione dei livelli di C1q inibitore, a testimonianza di un processo infiammatorio deregolato in atto. Infine, un accumulo della proteina precursore della beta-amiloide confermerebbe un pattern comune alle patologie neurodegenerative con formazione di aggregati proteici patologici (30), che contribuisce al danno neuronale.

Questo studio ha messo in evidenza come attraverso l'utilizzo di tecniche di sequenziamento avanzate e identificazione di biomarcatori proteomici, si possa migliorare la comprensione dei meccanismi della malattia e permettere ai professionisti di laboratorio e clinici una diagnosi precoce, fornendo screening personalizzati e cure di monitoraggio mirate.

## MARCATORI E NUOVE FRONTIERE DEL LABORATORIO DEL FUTURO

### Caratteristiche del repertorio TCR $\beta$ Spike-specifico in pazienti affetti da SARS-CoV-2

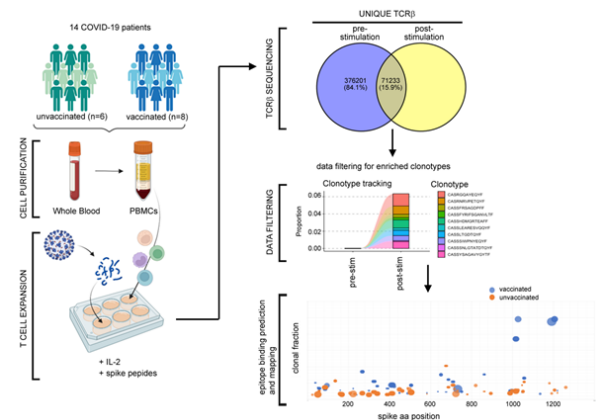
Il continuo evolvere delle varianti di SARS-CoV-2 permette al virus di eludere l'azione protettiva esercitata dalla vaccinazione o dall'immunità precedentemente instaurata (31); per questo motivo è fondamentale comprendere come il sistema immunitario si adatti a questi cambiamenti. I linfociti T specifici verso l'antigene Spike (AS), attivati dall'infezione o dalla vaccinazione, possono in gran parte tollerare le mutazioni degli aminoacidi che caratterizzano le diverse "variants of concern" (VoCs), incluse Delta e Omicron (32-34).

Il potenziale di risposta antigenica di una popolazione linfocitaria può essere valutato e rappresentato dal numero e dalla frequenza delle regioni geniche variabili del TCR (T-Cell receptor). Grazie ai recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento, è possibile analizzare queste regioni con alta precisione, ottenendo un inventario delle sequenze uniche e delle loro frequenze. Questo insieme di dati costituisce il repertorio del TCR, la cui analisi fornisce indicatori sintetici della diversità e

della clonalità delle cellule T. Questi indicatori riflettono le dinamiche delle risposte di queste cellule in contesti fisiopatologici, come le risposte immunitarie antivirali o antitumorali (35,36).

In uno studio condotto dal Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università Magna Graecia di Catanzaro è stato esaminato il repertorio TCR $\beta$  specifico per l'AS in individui affetti da COVID-19, sia vaccinati che non vaccinati, per identificare differenze nelle risposte T cellulari specifiche che potrebbero essere rilevanti nella previsione della progressione della malattia e dell'impatto delle VoCs. Sono stati arruolati 14 pazienti (8 vaccinati e 6 non vaccinati), tutti con una diagnosi attiva di COVID-19 e con sintomi da lievi a gravi. Le cellule mononucleate di sangue periferico di questi pazienti sono state stimolate con un pool di peptidi S in presenza di interleuchina-2 per 12 giorni per favorire l'espansione delle cellule T specifiche. Per ciascun paziente, le sequenze del TCR $\beta$  specifiche per AS sono state ottenute dal confronto tra i repertori di sequenze TCR $\beta$  pre-stimolazione e quelli post-stimolazione (Figura 2). L'applicazione dell'algoritmo di predizione GLIPH2 ha permesso di mappare le risposte S-specifiche individuali e di confrontare i profili di risposta tra i gruppi vaccinati e non vaccinati.

I risultati hanno messo in luce significative variazioni nella specificità del TCR tra i pazienti non vaccinati per COVID-19 e quelli vaccinati, evidenziando caratteristiche distintive dei repertori TCR $\beta$  che possono essere correlate alla gravità della malattia, con un possibile impatto sugli esiti clinici. In particolare, il repertorio TCR $\beta$  dei pazienti non vaccinati era significativamente associato alla regione S673-699, ritenuta possedere proprietà super-antigeniche, con capacità di evocare risposte infiammatorie esacerbate, categorizzabili tra quelle con significato immunopatologico sfavorevole del COVID-19.



**Figura 2**

Diagramma di flusso dello studio. Le cellule mononucleate del sangue periferico umano dei pazienti vaccinati e non vaccinati sono state purificate da sangue periferico e sottoposte a sequenziamento e/o ad espansione in seguito a stimolazione con un pool di peptidi derivanti da Spike, in presenza di interleuchina-2, andando a costituire i pool pre- e post-stimolazione. L'analisi del repertorio TCR $\beta$  ha coinvolto un passaggio di filtraggio per escludere sequenze confondenti non condivise tra coppie di repertori pre- e post-stimolazione.

Le analisi *in silico* hanno dimostrato che il legame dei TCR $\beta$  agli epitopi "selvatici" dell'AS non subiva interferenza dalle principali sostituzioni amminoacidiche osservate negli epitopi corrispondenti delle principali VoCs. Infine, l'analisi di clustering imparziale ha evidenziato che l'indice di similarità dei repertori (indice di Jaccard) potrebbe avere un interessante significato prognostico, poiché in grado di distinguere con buona accuratezza i pazienti con malattia lieve da quelli immunodepressi e/o con una prognosi peggiore del COVID-19. In conclusione, l'analisi del repertorio del TCR conferma il suo potenziale diagnostico in contesti in cui le dinamiche delle risposte adattive T cellulari sono fondamentali. L'estensione di questa analisi a un maggior numero di pazienti fornirà una valutazione più robusta di questo potenziale.

### **Ruolo delle cellule Natural Killer nella risposta al trattamento con Benralizumab in pazienti affetti da asma grave eosinofilo**

L'asma definito grave rimane non controllato nonostante l'utilizzo dei corticosteroidi inalatori ad alte dosi e dei beta-agonisti a lunga durata d'azione e il trattamento delle comorbilità. Per il fenotipo di asma definito "eosinofilo" sono disponibili nuovi anticorpi monoclonali che inibiscono il pathway molecolare dell'interleuchina 5 (IL-5) (37), come ad esempio Benralizumab che è specifico per IL-5R $\alpha$  e è in grado di indurre una deplezione rapida e quasi completa degli eosinofili (38). Un particolare meccanismo d'azione di questo farmaco è determinato dal suo frammento costante afucosilato (Fc) che lega i recettori Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) sulla membrana delle cellule Natural Killer (NK). Dopo questa interazione, le cellule NK attivano la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente attraverso il rilascio di proteine pro-apoptiche, come la perforina e il granzima B, che portano all'apoptosi degli eosinofili. È stato evidenziato che questo tipo di citotossicità risulta compromessa nei pazienti asmatici, soprattutto dopo l'utilizzo di corticosteroidi ad alto dosaggio (39). L'attività deregolata delle cellule NK può anche interferire con la clearance polmonare, contribuendo all'infiammazione cronica delle vie aeree e inducendo processi di rimodellamento. Tra i sottoinsiemi di cellule NK, CD56<sup>dim/neg</sup>CD16<sup>br</sup> è il sottoinsieme maturo, responsabile delle funzioni citotossiche delle cellule NK, mentre CD56<sup>br</sup>CD16<sup>neg</sup> è il sottoinsieme immaturo, responsabile delle funzioni omeostatiche delle cellule NK con alto potere proliferante e bassa citotossicità (40).

In uno studio condotto presso il laboratorio dell'Università di Siena sono stati valutati i cambiamenti specifici dei diversi sottotipi di cellule NK prima e dopo sei mesi di trattamento con Benralizumab in una popolazione di 19 pazienti, 9 con asma lieve/moderato e 10 con asma grave eosinofilo e 15 volontari sani (HC) tramite citometria a flusso multi-parametrica (tecnologia BD FACS Lyric™). L'analisi dei dati ha rilevato un aumento delle cellule CD56<sup>br</sup>CD16<sup>neg</sup> ed una diminuzione di quelle mature con capacità citotossica nei sottogruppi di cellule NK nei pazienti asmatici gravi rispetto al gruppo controllo ed al gruppo lieve/moderato. Inoltre, è stata dimostrata

per la prima volta la capacità proliferativa *in vivo* di queste cellule e la loro attivazione, tramite l'analisi di espressione del marcatore CD137, dopo la somministrazione di benralizumab. I dati ottenuti sostengono anche il ruolo cruciale dell'espressione di CD137 per l'attivazione della citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente nei pazienti con asma grave suggerendo che il farmaco può influenzare direttamente lo stato di attivazione delle cellule NK favorendo l'apoptosi degli eosinofili (41).

Questi dati nell'insieme contribuiscono a migliorare la comprensione dei meccanismi d'azione di benralizumab in combinazione con la diminuzione dell'uso di corticosteroidi nei pazienti asmatici gravi.

### **Alterazioni morfo-funzionali e quantitative delle piastrine come indici precoci di sepsi**

La sepsi è una disfunzione d'organo potenzialmente fatale causata dalla disregolazione della risposta immunitaria dell'ospite nei confronti dell'infezione, con un'incidenza di oltre 49 milioni di casi e 11 milioni di decessi nel mondo ogni anno (42). La diagnosi tardiva ed il trattamento inappropriato possono contribuire in maniera determinante all'esito infausto, per questo motivo è determinante identificare marcatori precoci di sepsi. Le piastrine, cellule effettrici principali sia nell'emostasi che nell'infiammazione, sono coinvolte in primo piano nella patogenesi della sepsi (43) ed alterazioni nella loro funzione possono contribuire all'insorgenza di numerose complicanze, sia emorragiche che trombotiche. L'identificazione di alterazioni morfo-funzionali e quantitative, tramite la valutazione degli indici piastrinici, può rivestire un importante ruolo nel riconoscimento precoce dei soggetti a rischio elevato di sepsi. La conta piastrinica è inclusa nel punteggio SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), essendo la trombocitopenia (<150 000/ $\mu$ L) strettamente associata alla gravità della malattia ed al tasso di mortalità. L'attivazione subclinica della coagulazione del sangue (ipercoagulabilità), la coagulazione intravascolare disseminata (DIC) e la trombopoiesi alterata sono condizioni spesso associate al quadro di sepsi, che in concomitanza alla risposta iper-infiammatoria globale dell'organismo e al rilascio di specie reattive dell'ossigeno e di enzimi proteolitici da parte dei neutrofili, conducono alla disfunzione d'organo multipla (44). La trombocitopenia si manifesta in modalità severa, moderata e relativa, rispettivamente nel 33%, 40% e 9% dei casi; con un aumento della mortalità del 40,6%, 21,1% e 27,8%, rispetto al 17,4% che si verifica nei pazienti non trombocitopenici. Un aumento del volume piastrinico medio (MPV, intervallo di riferimento 7,2 – 11,7 fl) riflette una produzione compensata di trombociti da parte del midollo osseo ed una loro attivazione, ed il suo rapporto con la conta piastrinica predice un peggioramento del quadro clinico ed un'aumentata mortalità nei pazienti settici, anche nei neonati o nelle 24 ore dopo il parto, in associazione con la Proteina C Reattiva (45). Recentemente, l'ampiezza di distribuzione piastrinica (PDW) si è mostrata essere un marcatore promettente, in quanto riflette e quantifica l'eterogeneità della morfologia piastrinica, aumentando a seguito della

loro attivazione. PDW è un parametro ad esclusivo uso di ricerca, non utilizzabile per procedure diagnostiche, che si rivela utile se associato alla valutazione di altri biomarcatori. Elevati valori di PDW sono stati associati ad un peggioramento del quadro clinico e ad un aumentato rischio di mortalità a 90 giorni dall'ammissione nei reparti di medicina interna (46). Inoltre, l'aumento di PDW e dell'ampiezza di distribuzione dei globuli rossi (RDW) al momento della diagnosi, associati ad una diminuzione della conta piastrinica e all'aumento dell'MPV durante la prima settimana, correlano significativamente alla mortalità nei pazienti settici (47). In conclusione, gli indici piastrinici sono marcatori di rapido ottenimento ed a basso costo che riflettono una coagulazione disfunzionale e una risposta infiammatoria sistemica presenti nelle condizioni settiche, potenzialmente utilizzabili come parte di un approccio integrato per la diagnosi precoce e la gestione della sepsi (48).

### CONCLUSIONI – YS: COSA CI ASPETTIAMO DAL FUTURO

La presente rassegna dei contributi scientifici esposti dal gruppo YS nel convegno del Dicembre 2023, mostra come la MdL continui ad evolversi rapidamente grazie ai progressi tecnologici, migliorando la capacità di diagnosticare malattie precocemente, personalizzare i trattamenti e monitorare l'efficacia delle terapie. Questa disciplina rappresenta infatti una componente essenziale della moderna assistenza sanitaria, con un impatto significativo sulla qualità della vita dei pazienti (49).

I professionisti del futuro dovranno affrontare sfide complesse e interdisciplinari, richiedendo una collaborazione sempre più stretta tra diverse aree del sapere, come gli approcci di multi-omica e biologia dei sistemi. In questo cambiamento, è fondamentale integrare nuove tecnologie emergenti sempre più sofisticate, come l'intelligenza artificiale (AI) e il machine learning, per garantire uno sviluppo ed uso responsabile e sostenibile, al servizio del progresso scientifico e della salute.

Queste tecnologie, se ben governate, consentiranno di creare nuovi algoritmi per fornire risultati interpretativi utili a personalizzare maggiormente la medicina sul paziente. L'enorme quantità di dati biochimici e molecolari ottenuti grazie a tecnologie moderne e ultrasensibili, come la spettrometria di massa, la citofluorimetria, il sequenziamento dell'intero genoma, potrà contribuire a migliorare la comprensione di numerose patologie complesse. Il contributo della MdL sui nuovi percorsi diagnostici e sulle corrette interpretazioni dei dati sarà cruciale nel prossimo futuro, così come il motore di una macchina complessa, con l'obiettivo comune di personalizzare gli approcci diagnostici per rendere le diagnosi più rapide e contestualmente velocizzare la presa in carico del paziente nel percorso di cura appropriato.

L'innovazione tecnologica, spesso percepita come un costo aggiuntivo, può rappresentare una fondamentale opportunità per rendere sostenibile il sistema sanitario nel lungo periodo (50).

Gli YS dovranno dunque rivestire il ruolo di pilota in questo processo di trasformazione, attraverso l'applicazione di approcci innovativi, su nuove strategie basate anche sui moderni mezzi social di comunicazione e la digitalizzazione dei processi, che stanno modificando il nostro modo di vivere.

### BIBLIOGRAFIA

- Sciacovelli L, Santini SA, Plebani M. Developing and enhancing all the professional activities for a successful future of Laboratory Medicine. *Biochim Clin* 2023;47 Suppl2:S69-73.
- Bellini C, Nannini S, Berardi M, Mosca A, Bernardini S, Sancesario G. Il "Libro Bianco" dei Giovani Professionisti di Medicina di Laboratorio in Italia: risultati dell'indagine del Gruppo di Studio SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020; 44:351-8.
- Ammirabile M, Aita A, Bartolini A, Spolaore F, Scapaticci M, Pellegrini C, et al. Impatto dell'emergenza COVID-19 nei laboratori: esperienze e opinioni dei SIBioC Young Scientists. *Biochim Clin* 2020; 44:21-2.
- D'Argenio V, Iorio E, Tomaiuolo R, Bellini C, Lenski M, Gianella E, et al. Comunicare nell'infosfera: sfide e opportunità per la Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2021; 45:290-8.
- Adler J, Lenski M, Tolios A, Fares Taie S, Sopic M, Rajdl D, et al. Digital competence in laboratory medicine. *JLM* 47; 2023:143-8.
- Rodari G. Il libro degli errori. Torino, Einaudi, 1964.
- Trasformare il nostro mondo: l'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile - Dipartimento per la Pubblica Informazione Nazioni Unite - 2015 <https://unric.org/it/wp-content/uploads/sites/3/2019/11/Agenda-2030-Onu-italia.pdf> (Ultimo accesso: maggio 2024).
- Sancesario G, Perrone MA, Pellegrini C, Ialongo C, Aita A, Dabla PK, et al. La medicina di laboratorio: gli specialisti di domani. *Biochim Clin* 2019; 43:424-34.
- Rampoldi E, Patrucco G, Casati M, Morelli B, Carraro P. Implementation and management of the point-of-care testing (PoCT): Essential indications. *Biochim Clin* 2021; 45:312-26.
- Charansonney OL, Al-Dandachi G, Plaisance P, Vicaut E. Evaluation of a new point-of-care diagnostic test measuring inflammation in emergency settings. *Sci Rep* 2023;13:19551.
- Borriello M, Tarabella G, D'Angelo P, Liboà A, Barra M, Vurro D, et al. Lab on a chip device for diagnostic evaluation and management in chronic renal disease: a change promoting approach in the patients' follow up. *Biosensors* 2023; 13:373.
- Della Ventura B, Banchelli M, Funari R, Illiano A, De Angelis M, Taroni P, et al. Biosensor surface functionalization by a simple photochemical immobilization of antibodies: experimental characterization by mass spectrometry and surface enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* 2019; 144:6871-80.
- Cascino P, Nevone A, Piscitelli M, Scopelliti C, Girelli M, Mazzini G, et al. Single-molecule real-time sequencing of the M protein: Toward personalized medicine in monoclonal gammopathies. *Am J Hematol* 2022; 97: E389-92.
- Nevone A, Girelli M, Mangiacavalli S, Paiva B, Milani P, Cascino P, et al. An N-glycosylation hotspot in immunoglobulin κ light chains is associated with AL amyloidosis. *Leukemia* 2022; 36:2076-85.
- Gazzetta Ufficiale. Decreto Ministeriale 9 Novembre 2015. Funzioni di Organismo Statale per la Cannabis Previsto

- dagli Articoli 23 e 28 della Convenzione Unica Sugli Stupefacenti del 1961, Come Modificata nel 1972. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/11/30/15A08888/sq;ises> (Ultimo accesso: settembre 2024).
16. MacCallum CA, Russo EB. Practical considerations in medical cannabis administration and dosing. *Eur J Intern Med* 2018; 49:12–19.
  17. Elsohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 2005; 78:539–48.
  18. Palermi A, Cafaro A, Barco S, Bucchioni P, Franceschini P, Cusato J, et al. Analysis of cannabinoids concentration in cannabis oil galenic preparations: Harmonization between three laboratories in northern Italy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14:462.
  19. Romano LL, Hazekamp A. Cannabis oil: Chemical evaluation of an upcoming cannabis- based medicine. *Cannabinoids* 2013; 1:1-11.
  20. Cangemi G, Bucchioni P, Tripodi G, Barco S, Franceschini P, Sbarbaro IM. Analysis of cannabinoids concentration in cannabis oil galenic preparations in the Liguria Region: experimental project of the regional reference laboratories. *Biochim Clin* 2020;44:367-79.
  21. Cafaro A, Conti M, Pigliasco F, Barco S, Bandettini R, Cangemi G. Biological Fluid Microsampling for Therapeutic Drug Monitoring: A Narrative Review. *Biomedicines* 2023, Vol 11, Page 1962 2023;11:1962. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11071962>
  22. Babu M, Snyder M. Multi-omics profiling for health. *Mol Cell Proteomics* 2023;22: 100561.
  23. Feldman EL, Goutman SA, Petri S, Mazzini L, Savelieff MG, Shaw PJ, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2022; 400:1363-80.
  24. Balendra R, Isaacs AM. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. Vol. 14, *Nature Reviews Neurology*. *Nat Rev Neurol* 2018; 14:544-58.
  25. Sproviero W, Shatunov A, Stahl D, Shoai M, van Rheenen W, Jones AR, et al. ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiol Aging* 2017; 51:178.e1-e9.
  26. Johnsen B. Diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis from El Escorial to Gold Coast. *Clin Neurophysiol* 2020; 131:1962-3.
  27. Thomas Q, Coarelli G, Heinzmann A, Le Ber I, Amador M del M, Durr A. Questioning the causality of HTT CAG-repeat expansions in FTD/ALS. *Neuron* 2021; 109:1945-6.
  28. Jih KY, Lai KL, Lin KP, Liao YC, Lee YC. Reduced-penetrance Huntington's disease-causing alleles with 39 CAG trinucleotide repeats could be a genetic factor of amyotrophic lateral sclerosis. *J Chin Med Assoc* 2023; 86:47-51.
  29. Brenner D, Müller K, Gastl R, Gorges M, Otto M, Pinkhardt EH, et al. Analysis of CACNA1A CAG repeat lengths in patients with familial ALS. *Neurobiol Aging* 2019; 74:235.e5-e8.
  30. Wilson DM, Cookson MR, Van Den Bosch L, Zetterberg H, Holtzman DM, Dewachter I. Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell* 2023; 186:693-714.
  31. DeGrace MM, Ghedin E, Frieman MB, Krammer F, Grifoni A, Alisoltani A, et al. Defining the risk of SARS-CoV-2 variants on immune protection. *Nature* 2022; 605:640-52.
  32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T(H)1 T cell responses. *Nature* 2020;586:594-9.
  33. Sette A, Sidney J, Crotty S. T Cell Responses to SARS-CoV-2. *Annu Rev Immunol* 2023; 41:343-73.
  34. Keeton R, Tincho MB, Suzuki A, Benede N, Ngomti A, Baguma R, et al. Impact of SARS-CoV-2 exposure history on the T cell and IgG response. *Cell Rep Med* 2023; 4:100898.
  35. Aversa I, Malanga D, Fiume G, Palmieri C. Molecular T-Cell Repertoire Analysis as Source of Prognostic and Predictive Biomarkers for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2020;21:2378.
  36. Musvosvi M, Huang H, Wang C, Xia Q, Rozot V, Krishnan A, et al. T cell receptor repertoires associated with control and disease progression following Mycobacterium tuberculosis infection. *Nat Med* 2023;29:258-69.
  37. Bergantini L, Pianigiani T, D'Alessandro M, Gangi S, Cekoria B, Bargagli E et al. The effect of anti-IL5 monoclonal antibodies on regulatory and effector T cells in severe eosinophilic asthma. *Biomed Pharmacother* 2023;166:115385.
  38. Lo Muzio G, Calò O, Cisternino C, Scarano P, Sanna A, De Filippis F, et al. Real life benralizumab effectiveness in patients with severe eosinophilic asthma after a 24-month observation. *Eur Resp J* 2022;60:2154.
  39. Dagher R, Kumar V, Copenhaver AM, Gallagher S, Ghaedi M, Boyd J et al. Novel mechanisms of action contributing to benralizumab's potent anti-eosinophilic activity. *Eur Resp J* 2022; 59:2004306.
  40. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational application. *Cell Mol Immunol* 2019; 16:430-41.
  41. Bergantini L, D'Alessandro M, Pianigiani T, Cekorja B, Bargagli E, Cameli P. Benralizumab affects NK cell maturation and proliferation in severe asthmatic patients. *Clin Immunol* 2023; 253:1096680.
  42. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020; 395:200-11.
  43. Cox D. Sepsis - it is all about the platelets. *Front Immunol* 2023; 14:1210219.
  44. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res* 2012; 129:290-5.
  45. Péju E, Fouqué G, Charpentier J, Vigneron C, Jozwiak M, Cariou A, et al. Clinical significance of thrombocytopenia in patients with septic shock: An observational retrospective study. *J Crit Care* 2023; 76:154293.
  46. Tzur I, Barchel D, Izhakian S, Swarka M, Garach-Jehoshua O, Krutkina E, et al Platelet distribution width: a novel prognostic marker in an internal medicine ward. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2019; 9:464-70.
  47. Dixit S, Arora JK, Kumar R, Arora R. Role of Routine Blood Parameters in Predicting Mortality Among Surgical Patients With Sepsis. *Cureus* 2023;15:e37413.
  48. Giglio RV, Ligi D, Della Franca C, Lo Sasso B, Rivas JZ, Agnello L, et al. Thrombocytopenia and hyperinflammation are induced by extracellular histones circulating in blood. *Clin Chem Lab Med* 2023;61:e239-43.
  49. Ferraro S, Panteghini M. Il futuro della medicina di laboratorio. *Biochim Clin* 2016; 40:75-7.
  50. Tomaiuolo R, Banfi G. From volume to value: a watershed moment for the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2023; 62:593-6.