



Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.

N.33/22

**MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEGLI IMMUNOSOPPRESSORI: CONFRONTO
TRA METODICA CLIA E LC-MS**

D'Aurora A (Chieti), Del Fine P. (Chieti), Indino F. (Lecce), Palumbieri V. (Termoli)

Rev. 1.0

SITLaB news

Pubblicato: 27 dicembre 2022

Copyright: © SITLaB

ABSTRACT

L'immunosoppressione richiede una terapia individualizzata, tenendo in considerazione fattori come età, condizione clinica del paziente, tempo trascorso dal trapianto e altri farmaci assunti. La dose di farmaco assunta dal paziente, infatti, deve essere tale da poter prevenire il rigetto d'organo, ma al tempo stesso non deve generare degli effetti tossici. Per questo motivo il Monitoraggio Terapeutico dei Farmaci (TDM) è fondamentale affinché la terapia immunosoppressiva possa generare un beneficio clinico al paziente. Il laboratorio deve quindi garantire che il test utilizzato sia il più sensibile e specifico possibile, così che anche il risultato ottenuto sia affidabile. Proprio per questo che in questo lavoro sono state valutate le differenze tra il metodo immunometrico e il metodo LC-MS. I risultati ottenuti indicano che quando bisogna scegliere il metodo analitico da adottare in laboratorio, bisogna valutare specificità, sensibilità e accuratezza del metodo, ma anche i costi.

INTRODUZIONE

Il Monitoraggio Terapeutico dei Farmaci (TDM) consiste nel dosare un farmaco su sangue intero o su plasma e la concentrazione così ottenuta viene poi impiegata per l'interpretazione da parte dei medici. Sorge la necessità che il risultato ottenuto rientri in un range terapeutico, al fine di evitare da un lato effetti collaterali, ma dall'altro garantire l'effetto terapeutico. Si evince quindi l'importanza di un'interpretazione appropriata, infatti, sulla base di essa, verrà individuato un regime terapeutico per il paziente [1].

Tra i farmaci per cui è indicato il TDM rientrano anche gli immunosoppressori. La terapia immunosoppressiva, infatti, viene impiegata in occasione di trapianti d'organo, per impedire il rigetto dell'organo stesso. Il TDM, dunque, è necessario perché la terapia che viene somministrata al paziente deve assicurare che non ci sia il rigetto, ma non deve nemmeno generare degli effetti tossici [2,3]. È fondamentale, quindi, prestare attenzione alla tempistica del prelievo di sangue, al tipo di campione di sangue, alla tecnica di misurazione e all'interpretazione dei risultati. Il ruolo del laboratorio è quello di garantire che il test utilizzato sia il più sensibile e specifico possibile.

I farmaci che sono presi in considerazione in questo lavoro sono Tacrolimus e Ciclosporina. Il Tacrolimus, un lattone macrociclico [4], e la Ciclosporina, un undecapeptide ciclico [5], sono

entrambi inibitori della calcineurina. Sono assorbiti nel tratto gastrointestinale [6,7] e vengono metabolizzati a livello del fegato tramite il Citocromo P-450 [8,9]. Entrando nella circolazione sistemica, entrambi i farmaci si legano agli eritrociti, ma solo la porzione di farmaco non legato è in grado di entrare nei linfociti ed esercitare i suoi principali effetti immunosoppressivi, ovvero un arresto della proliferazione e dell'attività dei Linfociti T [10].

Il metodo immunometrico e il metodo cromatografico, sono le metodiche analitiche maggiormente utilizzate per dosare le concentrazioni degli immunosoppressori. Quando si eseguono delle misurazioni, anche in laboratorio, è noto che i risultati ottenuti saranno affetti da errori, ovvero la differenza tra il valore ottenuto e quello vero. Ogni metodica analitica ha delle caratteristiche, ossia precisione, accuratezza, sensibilità e specificità; in base a questi parametri l'errore ottenuto dalla misurazione sarà più o meno grande, per cui ogni metodica analitica avrà una variabilità intrinseca. Tutto ciò implica che potrebbero essere ottenuti diversi risultati se si andasse a eseguire il dosaggio dei farmaci in diversi laboratori o utilizzando metodiche differenti [2,3]. Le tecniche immunometriche permettono una semplificazione della misura, alta produttività, sono automatizzabili e a basso costo; d'altro canto, queste metodiche possono essere soggette ad interferenze. Le tecniche cromatografiche (HPLC) accoppiate alla spettrometria di massa, invece, sono molto costose dal punto di vista strumentale, hanno necessità di competenza da parte del personale, sono poco automatizzabili, di conseguenza esecuzione con tempistiche maggiori, ma con specificità e sensibilità maggiori.

Le informazioni che dovrebbero essere riportate nel referto secondo le Raccomandazioni sul TDM degli Immunosoppressori sono: Valore di Concentrazione; Tempo di Prelievo relativo all'ultima assunzione; Matrice utilizzata; Intervallo Terapeutico indicativo nel paziente stabile trascorsi 3 mesi dal trapianto [2,3]. Un'altra informazione che dovrebbe essere riportata sul referto, come si evince dalle informazioni riportate sopra, è proprio il metodo analitico utilizzato. Bisogna tenere conto che il dato deve essere interpretato tenendo in considerazione la variabilità causata da eventuali terapie concomitanti, distanza di tempo dal trapianto, condizione clinica del paziente, funzionalità epatica e renale [2,3], oltre a considerare il rischio di rigetto e di infezioni. Sulla base del risultato del dosaggio effettuato in laboratorio si possono effettuare eventuali adattamenti alla terapia.

OBIETTIVO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è quello di definire qual è il ruolo del laboratorio nel Monitoraggio Terapeutico degli Immunosoppressori, confrontando le metodiche di dosaggio e identificando i criteri di refertazione, in maniera tale da poter fornire un risultato accurato, in tempi brevi e con una adeguata interpretazione per personalizzare la terapia.

MATERIALI E METODI

Per la realizzazione di questo lavoro sono stati presi in considerazione i pazienti ai quali è stato richiesto il dosaggio di Ciclosporina e Tacrolimus nel periodo compreso tra febbraio 2021 e febbraio 2022. Per ogni campione è stato effettuato il dosaggio di Ciclosporina e Tacrolimus (in base alla richiesta). I campioni utilizzati per il dosaggio prevedono un campione di sangue intero e raccolto in provette contenenti K3EDTA come anticoagulante e sono stati analizzati con strumentazione Abbott Architect ci16200. Inoltre, grazie ad una collaborazione con la Patologia Clinica dell'ospedale "Vito Fazzi" di Lecce, nata da un gruppo di lavoro di SITLAB, sono state fatte delle valutazioni riguardo il dosaggio con metodo immunometrico e con la metodica in liquido-massa (LC-MS). Anche il dosaggio con HPLC-MS prevedeva la raccolta di un campione di sangue intero e, per ognuno, è stato effettuato il dosaggio di Ciclosporina e Tacrolimus, in base alla richiesta.

La tecnica CLIA è una metodica immunometrica che sfrutta la reazione specifica tra un antigene (Ag) e un anticorpo (Ab) e la reazione chemiluminescente che ne deriva viene misurata in RLU (unità di luce relativa). Le tecniche immunometriche, come già descritto, hanno diversi vantaggi come rapidità, possibilità di analizzare più campioni nella stessa seduta analitica, sono automatizzabili e presentano una lettura ed un'elaborazione automatica dei risultati. Tuttavia, hanno lo svantaggio di essere soggetti ad interferenze della reazione immunologica e della rivelazione del segnale, nel caso in cui nel campione siano presenti molecole che danno una reazione crociata con l'Ab, oppure molecole che interferiscono con la formazione del complesso Ag-Ab.

Prima dell'analisi automatizzata è necessaria una fase di pretrattamento manuale, secondo procedura dosaggio Abbott Architect ci16200. La procedura di pretrattamento consiste nell'aggiungere a 200 μ L di campione di sangue intero, nel caso del dosaggio del tacrolimus, 200 μ L di reagente precipitante per l'estrazione; per la ciclosporina, si aggiungono 100 μ L di reagente di solubilizzazione per la lisi

e 400 µL di precipitante per l'estrazione. Successivamente si effettua una centrifugazione a 1300 rpm per 4 minuti. Il surnatante è inserito nei tubi di pretrattamento, i quali saranno poi caricati sullo strumento per l'analisi automatizzata. Eventuali diluizioni dei campioni devono essere eseguite prima del pretrattamento.

L'HPLC accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS) è una tecnica basata sulla separazione dei composti presenti all'interno di un campione, mediante HPLC (cromatografia liquida ad alte prestazioni), e come rivelatore è utilizzato lo spettrometro di massa, al fine di identificare ogni composto che è stato separato. Queste caratteristiche rendono il metodo altamente sensibile e specifico, il quale consente inoltre l'analisi di molecole di grandi dimensioni e non ci sono interferenze con la matrice utilizzata. Gli svantaggi, come è stato già discusso, sono principalmente i costi.

Prima dell'analisi è necessaria una purificazione del campione. A 100 µL di sangue intero vengono aggiunti 200 µL di precipitante e 20 µL di standard interno. Seguono una incubazione e una centrifugazione a 10.000 g per 5 minuti. 50 µL del surnatante sono iniettati per eseguire analisi con LC-MS/MS.

I dati così ottenuti sono stati analizzati, calcolando parametri come Differenza, Media, Bias, Deviazione Standard, Lower LOA (Limit of Agreement), Upper LOA (Limit of Agreement), Mediana e Quartili, necessari alla rappresentazione grafica. Per la realizzazione della Regressione di Passing-Bablok è stato utilizzato MedCalc, software statistico, il quale ha fornito anche i valori dell'intercetta A e del coefficiente B.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per quanto riguarda la comparazione di due metodiche analitiche per il dosaggio di Ciclosporina, ovvero la CLIA e la LC-MS, si analizzano i seguenti risultati.

Dal Grafico 1, un Bland-Altman Plot, si può notare che, delle 12 misurazioni fatte, eseguite ciascuna singolarmente, con le due metodiche analitiche per il dosaggio della ciclosporina (CLIA e HPLC-MS), solo 2 di esse ricadono al di fuori degli estremi dell'intervallo di confidenza calcolato al 95% (Media delle Differenze \pm 1,96*Standard Deviation). Per valutare che i due metodi siano interscambiabili bisognerebbe analizzare i risultati ottenuti sulla base dei limiti di agreement

(accordo) nel contesto clinico. L'ampiezza massima dell'intervallo di confidenza che permette di determinare l'interscambiabilità delle tecniche, va quindi stabilita secondo fattori clinici e fattori teorici. Se si determina, dunque, che l'ampiezza dell'intervallo di confidenza (-126,106; +214,089) non è rilevante dal punto di vista clinico i due metodi possono essere utilizzati interscambiabilmente. Altre considerazioni che possono essere fatte dal grafico è l'andamento dei punti: si può notare, infatti, che ci sono 10 punti che si distribuiscono intorno allo zero, questo indica l'assenza di errore sistematico e che i due dosaggi possono essere utilizzati interscambiabilmente.

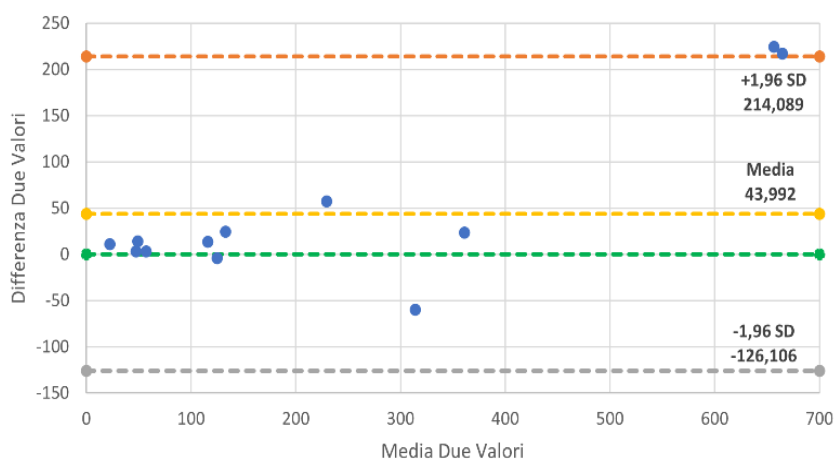


Grafico 1. Bland-Altman Plot per confronto tra CLIA e LC-MS per dosaggio Ciclosporina

Il Grafico 2, invece, è un Box and Whisker Plot, il quale permette di visualizzare la distribuzione dei dati attraverso i loro quartili. I valori che possono essere osservati sono massimo, minimo, mediana, primo quartile e terzo quartile. Da questo grafico si possono innanzitutto notare le “boxes”, entrambe le mediane si sovrappongono tra le due scatole, le quali hanno “lunghezze” (differenze tra terzo quartile e primo quartile) molto simili. Inoltre, si può notare che entrambe le mediane sono vicine alla parte inferiore della scatola, questo a dimostrazione del fatto che la distribuzione dei dati è asimmetrica. Successivamente si possono osservare i “whiskers”; la distribuzione dei dati del dosaggio della ciclosporina con dosaggio CLIA è più ampia rispetto a quella con dosaggio HPLC-MS: ciò implica una maggiore variabilità dei dati ottenuti con metodica CLIA rispetto alla LC-MS. Si possono anche osservare in entrambe le distribuzioni dei due dosaggi dei valori outliers.

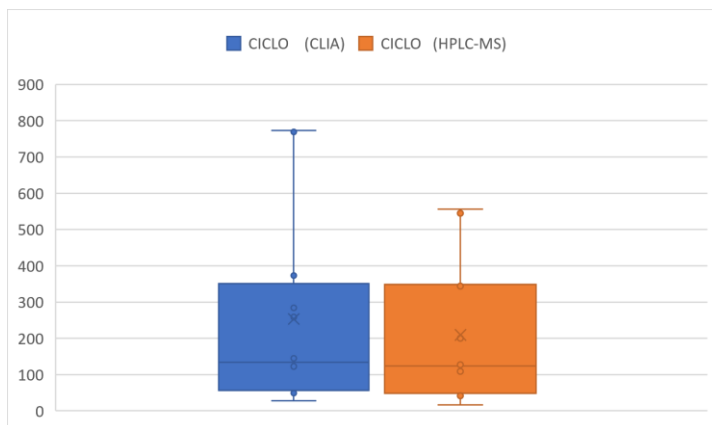


Grafico 2. Box and Whisker Plot per confronto tra CLIA e LC-MS per dosaggio Ciclosporina

Anche nella Regressione di Passing-Bablok (altra rappresentazione grafica utilizzata per effettuare un confronto tra metodiche analitiche), mostrata nel

Grafico 3, sono stati calcolati degli intervalli di confidenza del 95%. Questa regressione adatta i parametri A e B dell'equazione lineare $y = a + bx$ utilizzando metodi non parametrici. Dai dati generati dal software utilizzato per creare il grafico, riportati in Figura 1, si può osservare che il valore 0 è compreso nell'intervallo di confidenza dell'intercetta A, dimostrando l'assenza di una differenza sistematica; si può anche notare che il valore 1 è compreso nell'intervallo di confidenza nel coefficiente B, dimostrando l'assenza di una differenza proporzionale tra i due dosaggi. Questi dati indicano che i due metodi analitici sono tra loro equivalenti. La correlazione tra i due dosaggi può essere così riassumibile: Valore ottenuto con Ciclosporina (CLIA) = $0,817 \cdot (\text{Valore ottenuto con Ciclosporina (HPLC-MS)}) + 4,008$.

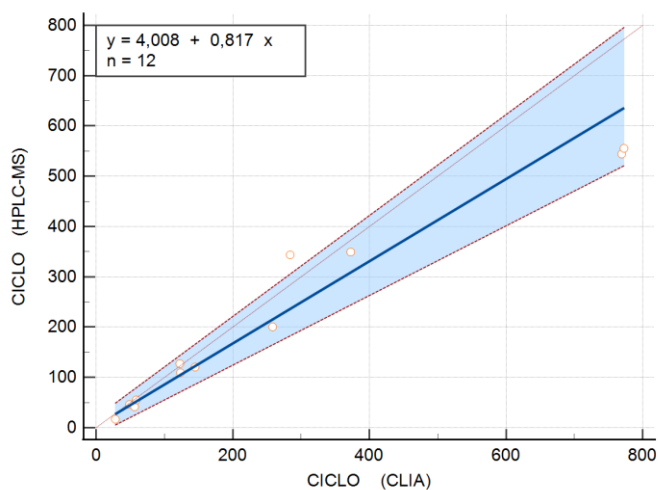


Grafico 3. Regressione di Passing-Bablok per confronto tra CLIA e LC-MS per dosaggio Ciclosporina

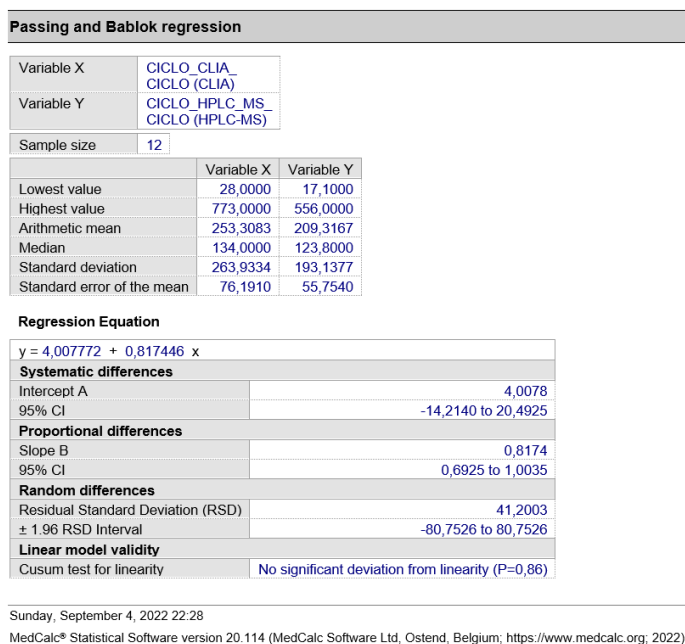


Figura 1. Valori necessari all'interpretazione della regressione di Passing-Bablok (Grafico 3)

Per quanto riguarda il dosaggio del Tacrolimus con entrambe le metodiche, invece, si analizzano i seguenti dati.

Dal Grafico 4 si può notare che, delle 17 misurazioni fatte, eseguite ciascuna singolarmente, con le due metodiche analitiche per il dosaggio del tacrolimus (CLIA e HPLC-MS), solo una di esse ricade al di fuori degli estremi dell'intervallo di confidenza. Anche in questo caso, come per il Grafico 1, per determinare che i due metodi siano interscambiabili, bisognerebbe valutare se l'ampiezza dell'intervallo di confidenza (-0,531; +0,956) non è rilevante dal punto di vista clinico. Altre considerazioni che possono essere fatte dal grafico è l'andamento dei punti; si può notare, infatti, che ci sono 15 punti che si distribuiscono intorno allo zero, questo indica l'assenza di errore sistematico e che i due dosaggi possono essere utilizzati interscambiabilmente.

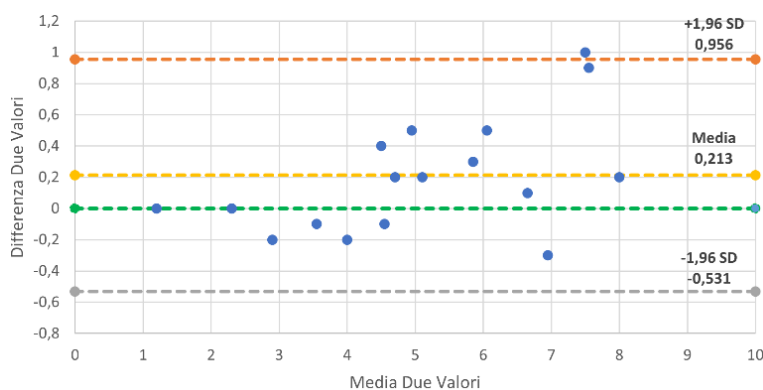


Grafico 4. Bland-Altman Plot per confronto tra CLIA e LC-MS per dosaggio Tacrolimus

Anche per il grafico 5, un Box and Whisker Plot, come per il Grafico 2, si valutano le “boxes” e i whisker”. Le mediane si sovrappongono tra le due scatole, le quali hanno lunghezze simili. Si può inoltre notare che la mediana della distribuzione dei dati del dosaggio con CLIA è posizionata al centro della scatola, quindi, i dati sono disposti in maniera simmetrica; la mediana della distribuzione dei dati del dosaggio con HPLC-MS, invece, è spostata dal centro, quindi i dati sono disposti asimmetricamente. Dai “whisker” si può osservare anche in questo caso una variabilità di dati maggiore ottenuta con il dosaggio CLIA rispetto al dosaggio HPLC-MS. In entrambe le distribuzioni comunque sono presenti valori outliers.

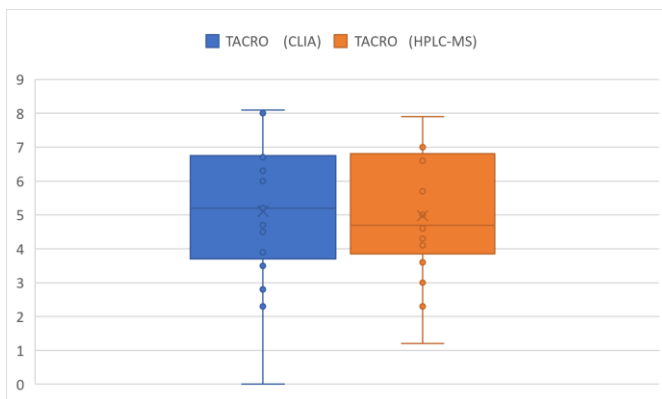


Grafico 5. Box and Whisker Plot per confronto tra CLIA e LC-MS per dosaggio Tacrolimus

Per la Regressione di Passing-Bablok, mostrata nel Grafico 6, sono state fatte le stesse considerazioni fatte per il Grafico 3, grazie ai dati riportati in Figura 2. Per cui si

può dire che, anche in questo caso, c'è l'assenza di differenza sistematica e di differenza proporzionale tra i due dosaggi. Questi dati indicano quindi che i due metodi analitici siano tra loro equivalenti. La correlazione tra i due dosaggi può essere così riassumibile: Valore ottenuto con Tacrolimus (CLIA) = $0,875 \cdot (\text{Valore ottenuto con Tacrolimus (HPLC-MS)}) + 0,450$.

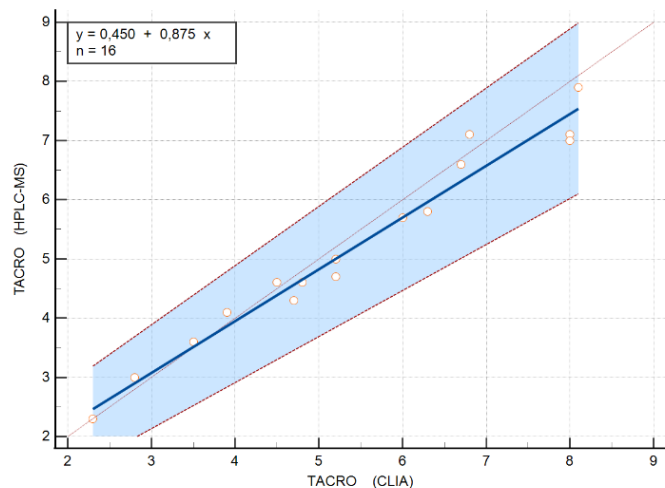


Grafico 6. Regressione di Passing-Bablok per confronto tra CLIA e LC-MS per dosaggio Tacrolimus

Passing and Bablok regression		
Variable X	TACRO_CLIA TACRO (CLIA)	
Variable Y	TACRO_HPLC_MS TACRO (HPLC-MS)	
Sample size	16	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	2,3000	2,3000
Highest value	8,1000	7,9000
Arithmetic mean	5,4250	5,2125
Median	5,2000	4,8500
Standard deviation	1,8182	1,6157
Standard error of the mean	0,4546	0,4039
Regression Equation		
$y = 0,450000 + 0,875000 x$		
Systematic differences		
Intercept A	0,4500	
95% CI	-0,2000 to 0,8889	
Proportional differences		
Slope B	0,8750	
95% CI	0,7778 to 1,0000	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	0,2348	
± 1.96 RSD Interval	-0,4602 to 0,4602	
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,92)	

Sunday, September 4, 2022 22:59

MedCalc® Statistical Software version 20.114 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022)

Figura 2. Valori necessari all'interpretazione della regressione di Passing-Bablok (Grafico 6)

Dal confronto di questi grafici possiamo evincere, sia per quanto riguarda il dosaggio del tacrolimus che della ciclosporina, che il dosaggio con metodo CLIA dia risultati più variabili rispetto al

metodo HPLC-MS. Tuttavia, si può anche dire che i grafici ci indicano che i metodi possono essere utilizzati interscambiabilmente.

Un'altra considerazione che può essere fatta riguardo al confronto tra le due metodiche analitiche è la valutazione dei costi. Per quanto riguarda l'utilizzo del metodo immunometrico, il costo di 100 test è di 200€, mentre il costo di 100 test con LC-MS è di 6880€. Data quindi questa differenza di prezzo e considerando che non si è notata una notevole differenza tra i risultati ottenuti con le due diverse metodiche, per il laboratorio sarebbe più conveniente, dal punto di vista economico, effettuare un saggio immunometrico rispetto a quello LC-MS. L'utilizzo della LC-MS, d'altro canto, avendo una specificità maggiore, dovuta al suo sistema di rivelazione, permette di avere una conferma maggiore del risultato ottenuto. Questa tecnica permette anche di andare a visionare e valutare il cromatogramma e lo spettrogramma ottenuti dall'analisi stessa. Bisogna sempre ricordare, quindi, come è stato descritto nell'introduzione, che i metodi hanno una variabilità intrinseca, per cui eseguire il dosaggio con tecniche analitiche differenti, può portare ad avere dei risultati differenti.

CONCLUSIONI

Dalla valutazione delle differenze tra metodiche analitiche si può capire che, quando viene scelto che tipo di dosaggio utilizzare all'interno del laboratorio, è opportuno prendere questa decisione in base

a sensibilità, specificità e accuratezza del metodo analitico, ma anche in base ai costi. Alla luce di queste informazioni si può capire l'importanza della fase di refertazione. Il referto, infatti, dovrebbe indicare tutte le variabili individuali che possono influenzare il risultato, le metodiche analitiche utilizzate e le variabili preanalitiche. Il TDM degli immunosoppressori, inoltre, non implica semplicemente eseguire il dosaggio di un farmaco, ma deve essere anche uno strumento tale da consentire al clinico di poter chiedere consigli al laboratorio riguardo i risultati ottenuti, al fine di consentire una corretta interpretazione di essi. Sarebbe per cui consigliabile una comunicazione diretta tra il laboratorista e il medico richiedente il dosaggio.

Sarebbe anche opportuna una comunicazione diretta tra il laboratorista con il medico richiedente il dosaggio, per poter interpretare appropriatamente i risultati ottenuti.

Concludendo, il laboratorio riveste un ruolo fondamentale nel Monitoraggio Terapeutico degli Immunosoppressori, in quanto, il risultato prodotto ha un impatto diretto sulla terapia del paziente e quindi sul beneficio ad essa associata. Si evidenzia, inoltre, l'importanza che, al giorno d'oggi, assume il referto clinico, soprattutto in casi come il dosaggio degli immunosoppressori, il referto deve necessariamente fornire tutte le informazioni necessarie al clinico per l'interpretazione del dato analitico.



BIBLIOGRAFIA

1. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med.* 2009 Mar;24(1):1-10.
2. Raccomandazioni AISF-SIF-SITO Versione del 3.1.2017.
3. Documento del Gruppo di Lavoro Società Italiana di Nefrologia – Società Italiana di Farmacologia – Società Italiana Trapianti d'organo e con il patrocinio dell'International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. Raccomandazioni sul TDM degli immunosoppressori nel trapianto di rene negli adulti.
4. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit.* 1995; 17:584–591.
5. Borel JF. Cyclosporin-A--present experimental status. *Transplant Proc.* 1981 Mar;13(1 Pt 1):344-8.
6. Ericzon BG, Ekqvist B, Groth CG, Säwe J. Pharmacokinetics of FK 506 during maintenance therapy in liver transplant patients. *Transplant Proc.* 1991 Dec;23(6):2775-6.
7. Gerson B. Cyclosporine. *J Clin Immunoassay* 1985;8(3):177-184.
8. Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos.* 1992 Sep-Oct;20(5):753-61.
9. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther.* 1993 Feb-Mar;57(2-3):291-345.
10. Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2013 Oct;23(10):563-85.