



Il Convegno Nazionale SITLaB  
Chieti 10-11 giugno 2023

SITLab - Società Scientifica Italiana dei TSLB



## CONFRONTO TRA GENERAZIONI DI REATTIVO PER IL DOSAGGIO DELLA CICLOSPORINA

D'Aurora A.<sup>1</sup>, Del Fine P.<sup>1</sup>, Indino F.<sup>2</sup>, Palumbieri V.<sup>3</sup>, Bertolini M.<sup>4</sup>, Peri B.<sup>5</sup>, Pitucco G.<sup>6</sup>, Petruccioli L.<sup>7</sup>

1. U.O.C. Patologia Clinica di Chieti, ASL 02 ABRUZZO – 2. U.O. Patologia Clinica e Microbiologia del P.O. “Vito Fazzi”, ASL Lecce – 3. Patologia Clinica Ospedale San Timoteo Termoli, ASREM – 4. IFO IRCCS, Roma – 5. U.O.S. Attività di Settorato, Fondazione Policlinico Gemelli di Roma – 6. Patologia Clinica, Microbiologia e Virologia, ISMETT Palermo – 7. U.O.C. Patologia Clinica di Vasto, ASL 02 ABRUZZO

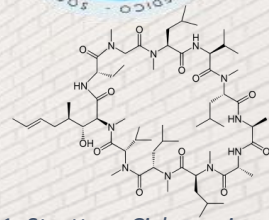


Figura 1. Struttura Ciclosporina

### INTRODUZIONE

La Ciclosporina (Figura 1) è un undecapeptide ciclico [1] con azione immunosoppressiva dovuta all'alterazione della trascrizione del recettore dei Linfociti T del gene IL-2 [2] e ha come bersaglio la ciclofilina [3]. La Ciclosporina, come gli altri farmaci immunosoppressori, i quali sono usati per impedire il rigetto di un trapianto d'organo, ha necessità di essere sottoposta a Monitoraggio Terapeutico dei Farmaci (TDM), in quanto presenta variabilità interindividuale e un ristretto indice terapeutico [4,5]. Il TDM è dunque necessario affinché la dose di farmaco che viene somministrata al paziente deve assicurare che non ci sia il rigetto ma al tempo stesso senza generare degli effetti tossici. Il ruolo del laboratorio è quello di garantire un risultato il più accurato possibile. Il referto, inoltre, come indicato dalle Raccomandazioni sul TDM degli Immunosoppressori dovrebbe contenere le seguenti informazioni: Valore di Concentrazione; Tempo di Prelievo relativo all'ultima assunzione; Matrice utilizzata; Intervallo Terapeutico indicativo nel paziente stabile trascorsi 3 mesi dal trapianto [4,5]. Data la variabilità intrinseca dei metodi analitici, sarebbe opportuno riportare nel referto anche la metodica utilizzata. Sulla base del dosaggio eseguito in laboratorio, ma anche grazie ad un'appropriata interpretazione del referto, si possono effettuare eventuali adattamenti alla terapia. Questo lavoro si pone dunque l'obiettivo di comparare due generazioni di reattivo per il dosaggio della Ciclosporina utilizzando la tecnica CMIA, valutando parametri come Differenza, Media, Bias, Deviazione Standard, Lower LOA, Upper LOA, Mediana e Quartili, al fine di rivalutare i criteri di refertazione in uso.

### OBIETTIVO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è quello di comparare due generazioni di reattivo per il dosaggio della Ciclosporina (Cyclo e CycloA), in seguito all'aggiornamento dei reagenti da parte della ditta produttrice Abbott, al fine di rivalutare i criteri di refertazione, andando a modificare gli intervalli di riferimento attualmente in uso in laboratorio. Questo permette di fornire un risultato accurato con una adeguata interpretazione per poter personalizzare la terapia del paziente.

### MATERIALI E METODI

Per la realizzazione di questo lavoro sono stati presi in considerazione pazienti ai quali è stato richiesto il dosaggio della Ciclosporina. I campioni utilizzati per il dosaggio prevedono un campione di sangue intero raccolto in provette contenenti  $K_3EDTA$  come anticoagulante. I campioni sono stati analizzati con tecnica CMIA con strumentazione Abbott Architect ci16200. Prima dell'analisi automatizzata è necessaria una fase di pretrattamento manuale durante la quale il campione di sangue intero su cui va dosata la Ciclosporina viene lisato con un reagente di solubilizzazione, estratto con un reagente di precipitazione e centrifugato. Il surnatante è poi versato nei tubi di pretrattamento e analizzato. La Figura 2 mostra le fasi del pretrattamento. Sono stati dosati 86 campioni sia con il reattivo di prima generazione (Cyclo) sia con il reattivo di seconda generazione (CycloA) e poi sono stati comparati i risultati ottenuti. L'analisi dei dati è stata eseguita 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.



Figura 2. Passaggi della Fase di Pretrattamento Manuale

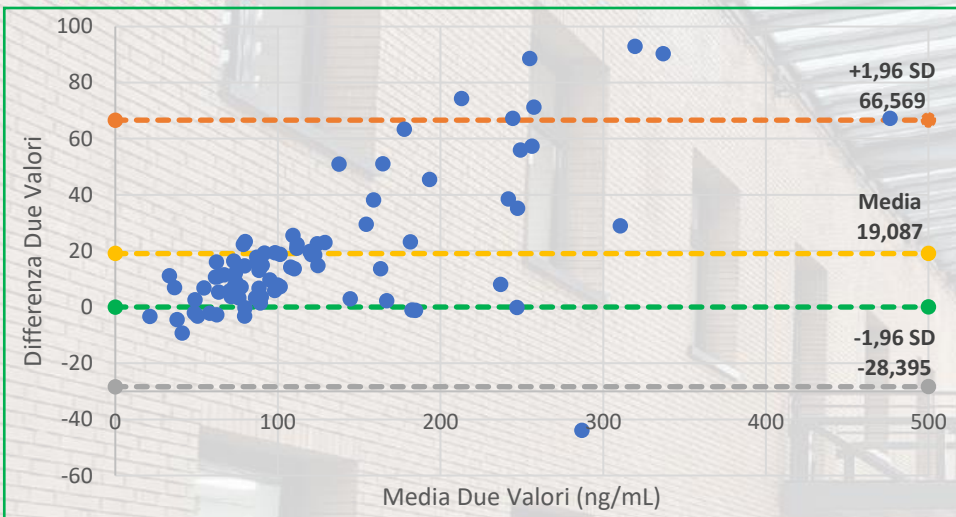


Grafico 1. Bland-Altman Plot per confronto tra due generazioni di reattivi per il dosaggio della Ciclosporina

Grafico 2. Box and Whisker Plot per confronto tra due generazioni di reattivi per il dosaggio della Ciclosporina

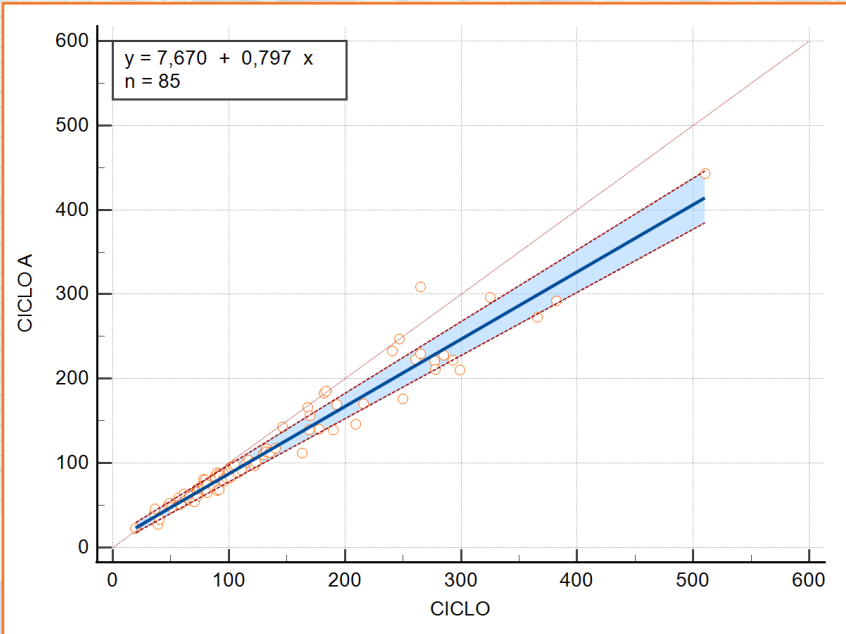
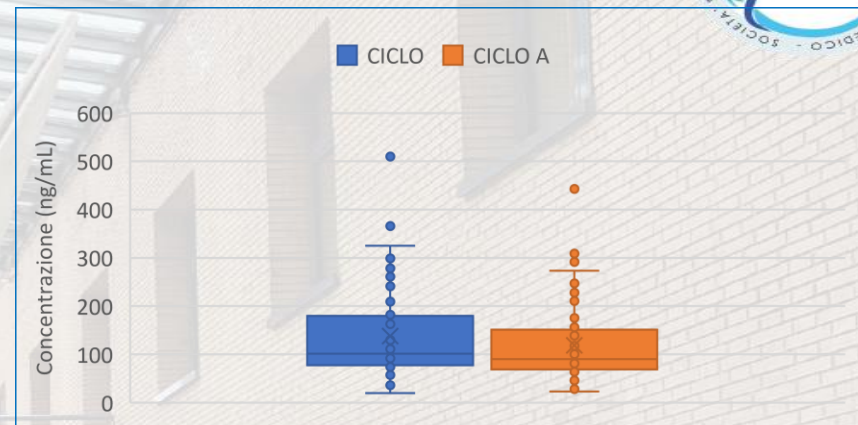


Grafico 3. Regressione di Passing-Bablok per confronto tra due generazioni di reattivi per il dosaggio della Ciclosporina

Figura 3. Valori necessari all'interpretazione della Regressione di Passing-Bablok

Passing and Bablok regression		
Variable X	CICLO	
Variable Y	CICLO_A CICLO A	
Sample size	85	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	19,6000	22,9000
Highest value	510,0000	442,8000
Arithmetic mean	137,6659	118,5788
Median	101,4000	90,3000
Standard deviation	91,6368	76,0719
Standard error of the mean	9,9394	8,2512
<b>Regression Equation</b>		
$y = 7,669509 + 0,797158 \times x$		
<b>Systematic differences</b>		
Intercept A	7,6695	
95% CI	3,0426 to 12,8157	
<b>Proportional differences</b>		
Slope B	0,7972	
95% CI	0,7482 to 0,8495	
<b>Random differences</b>		
Residual Standard Deviation (RSD)	13,2855	
± 1.96 RSD Interval	-26,0395 to 26,0395	
<b>Linear model validity</b>		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,92)	
Thursday, October 6, 2022 20:34		
MedCalc® Statistical Software version 20.115 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <a href="https://www.medcalc.org">https://www.medcalc.org</a> ; 2022)		



### RISULTATI

Dal Grafico 1, un Bland-Altman Plot, si può notare che delle 86 misurazioni fatte, eseguita ciascuna singolarmente, con entrambe le generazioni di reattivo per il dosaggio della ciclosporina (Cyclo e CycloA), 8 di esse ricadono al di fuori degli estremi dell'intervallo di confidenza calcolato al 95% (Media delle Differenze  $\pm 1,96 \cdot \text{Standard Deviation}$ ). 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 (-28,395; +66,569) 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 dei punti che si distribuiscono intorno allo zero, questo indica l'assenza di errore sistematico, ma si può anche osservare come, intorno ad una concentrazione di 100 ng/mL, i punti tendono verso l'alto. Questo potrebbe significare che i due dosaggi sono interscambiabili per valori inferiori a 100 ng/mL, ma non al di sopra.

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. 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 Cyclo è più ampia rispetto a quella di CycloA: ciò implica una maggiore variabilità dei dati ottenuti con metodica Cyclo rispetto alla CycloA. Si possono anche osservare in entrambe le distribuzioni dei due dosaggi dei valori outliers.

Anche nella Regressione di Passing-Bablok, 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 3, si può osservare che il valore 0 non è compreso nell'intervallo di confidenza dell'intercetta A, dimostrando l'esistenza di una differenza sistematica, per cui i dosaggi effettuati con i due reattivi differiscono di una quantità costante; si può anche notare che il valore 1 non è compreso nell'intervallo di confidenza nel coefficiente B, dimostrando l'esistenza di una differenza proporzionale tra i due dosaggi. La correlazione tra i due dosaggi può essere così riassumibile: Valore ottenuto con CycloA =  $0,797 \cdot (\text{Valore ottenuto con Cyclo}) + 7,670$ .

Dalla valutazione di questi grafici si può evincere quindi che c'è una differenza tra i due dosaggi della ciclosporina eseguiti con due generazioni di reattivi diverse; in particolare, come fa notare il Grafico 1, questa differenza incrementa a concentrazioni di ciclosporina maggiori di 100 ng/mL.

### CONCLUSIONI

Dalla comparazione delle due generazioni di reattivo per il dosaggio della Ciclosporina, dato che sono state riscontrate delle differenze nel dosaggio stesso, si può capire quanta variabilità possa esserci in queste tipologie di esami. Per cui il ruolo del laboratorio in questo caso potrebbe essere quello di indicare in fase di refertazione la metodica analitica utilizzata; questa valutazione, infatti, ha permesso di rivalutare i criteri di refertazione all'interno del laboratorio. Potrebbe inoltre essere consigliato al paziente, dove questo è possibile, di effettuare il monitoraggio sempre nello stesso laboratorio, affinché i dati ottenuti nel tempo possano anche essere tra loro confrontabili. Alla luce di queste informazioni si può capire l'importanza della fase di refertazione e che sarebbe opportuna una comunicazione diretta tra il laboratorista e il medico richiedente il dosaggio, al fine di poter interpretare appropriatamente i risultati ottenuti, i quali hanno un impatto diretto sulla terapia del paziente e quindi sul beneficio ad essa associata.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] Borel JF. Cyclosporin-A--present experimental status. *Transplant Proc.* 1981 Mar;13(1 Pt 1):344-8. [2] Quesniaux VF. Immunosuppressants: tools to investigate the physiological role of cytokines. *Bioessays.* 1993 Nov;15(11):731-9. [3] Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 Mar;2(2):374-84. [4] Raccomandazioni AISF-SIF-SITO Versione del 3.1.2017. [5] Documento del GdL SIN – SIF – SITO e con patrocinio IATDMCT. Raccomandazioni sul TDM degli immunosoppressori nel trapianto di rene negli adulti.